

**ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG
VON AKROSIN, EINEM PROTEOLYTISCHEN
ENZYM AUS EBERSPERMIEN**

Wolf-Dieter Schleuning

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551911_0019

AUS DEM INSTITUT FÜR KLINISCHE CHEMIE UND KLINISCHE BIOCHEMIE
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
KOMMISSARISCHER LEITER: PROFESSOR DR. H. FRITZ

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON AKROSIN,
EINEM PROTEOLYTISCHEN ENZYM AUS EBERSPERMIEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der
gesamten Medizin verfaßt und einer
Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Wolf-Dieter Schleuning
aus
Görlitz

München 1974

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München



Berichterstatter: Prof. Dr. Hans Fritz

Dekan: Prof. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.3.1975

Meine Frau, die ich in der Welt der Wissenschaften
mit mir teilhaben lasse, die mich in der Welt der
Kunst und der Literatur mit mir teilhaben lasse.

Meine Frau, die mich in der Welt der Wissenschaften
mit mir teilhaben lasse, die mich in der Welt der
Kunst und der Literatur mit mir teilhaben lasse.

Meine Frau, die mich in der Welt der Wissenschaften
mit mir teilhaben lasse, die mich in der Welt der
Kunst und der Literatur mit mir teilhaben lasse.

Meiner lieben Frau gewidmet

Herrn Prof. Dr. Dr. E. Werle und Herrn Prof. Dr. H. Fritz
danke ich für die Überlassung des Themas und für wertvolle
Hinweise und Ratschläge.

Weiterhin danke ich Herrn Dipl.-Chem. H. Schießler für viele
fruchtbare Diskussionen und Anregungen.

Frau Ruža Hell danke ich für hervorragende technische Assistenz.

INHALTSVERZEICHNIS

Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

	Seite
1 Einleitung und Aufgabenstellung	1
2 Einführende Übersicht	3
2.1 Die "Kapazitation" der Spermien und der Befruchtungsvorgang	3
2.2 Zur Morphologie und Biochemie von Spermium und Ovum	4
2.3 Corona-penetrating enzyme (CPE) und Dekapazitationsfaktor (DF)	5
2.4 Das Akrosin und die Verschmelzung der Gameten	5
2.5 Die Akrosininhibitoren	7
2.6 Bisherige Untersuchungen über die proteolytische Aktivität von Spermien und Spermienextrakten	9
3 Akrosin aus Eberspermien: Isolierung und Charakterisierung	11
3.1 Gewinnung und Extraktion der Spermien	11
3.2 Trennung des Akrosins von den Inhibitoren durch Gelfiltration	14
3.3 Affinitätschromatographie	16
3.3.1 Allgemeines	16
3.3.2 Reinigung von Eberakrosin unter Verwendung von p-Aminobenzamidin succinylaminohexyl-Cellulose (ABA-SAH-Cellulose)	17
3.4 Stabilisierung des Akrosins	21
3.5 Eigenschaften des gereinigten Akrosins	23
3.5.1 Spaltspezifität und pH-Optima	23
3.5.2 Elektrophoretische Untersuchungen	25

		Seite
3.5.3	Molekulargewichtsabschätzung	27
3.5.4	Untersuchungen zur Kinetik der Spaltung von N ^α -Benzoyl-L-Arginin-äthylester und N ^α -Benzoyl-L-Arginin-p-nitroanilid	33
3.5.5	Titration mit p-Nitrophenyl p'-guanidinobenzoat	38
3.5.6	Gelfiltration an Sephadex G-100	43
3.5.7	Ionenaustauschchromatographie an SP-Sephadex C-50	44
3.5.8	Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren mittels der Dansyltechnik	45
3.5.9	Aminosäurezusammensetzung	47
4	Material und Methoden	49
4.1	Material	49
4.1.1	Substrate	49
4.1.2	Materialien für Säulenchromatographie	49
4.1.3	Materialien für die Polyacrylamidgel-Elektrophorese	49
4.2	Methoden	50
4.2.1	Gewinnung der Spermien und Vorbereitung zur Extraktion	50
4.2.2	Saure Extraktion	50
4.2.3	Konzentration der Extrakte durch Ultrafiltration	51
4.2.4	Gelfiltration über Sephadex G-75	51
4.2.5	Affinitätschromatographie unter Verwendung von p-Aminobenzamidin succinylaminohexal-Cellulose	51
4.2.6	Entsalzung und Lyophilisierung	52
4.2.7	Verwendete Enzymtest-Systeme	53
4.2.8	Bestimmung der pH-Optima der Spaltung der verwendeten Substrate	53
4.2.9	Elektrophoretische Prüfung auf Einheitlichkeit	54
4.2.10	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Molekulargewichtsabschätzung)	55

	Seite
4.2.11 Kinetik der Spaltung von N^{α} -Benzoyl-L-Arginin-äthylester und N^{α} -Benzoyl-L-Arginin-p-nitroanilid	55
4.2.12 Titration mit p-Nitrophenyl p'-guanidinobenzoat	56
4.2.13 Gelfiltration über Sephadex G-100	56
4.2.14 Ionenaustauschchromatographie an SP-Sephadex C-50	56
4.2.15 Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren	57
5 Ausblick	58
6 Zusammenfassung	60
7 Literaturverzeichnis	62
Lebenslauf	70

Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

ABA-SAH-C	p-Aminobenzamidin-succinylaminohexyl-Cellulose
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
BAEE	N ^α -Benzoyl-DL-Arginin-äthylester
BAPA	N ^α -Benzoyl-DL-Arginin-p-nitroanilid
L-BAPA	N ^α -Benzoyl-L-Arginin-p-nitroanilid
BLNA	N ^α -Benzoyl-DL-Lysin-p-nitroanilid
BTEE	N ^α -Benzoyl-L-Tyrosin-äthylester
Dansyl	5-Dimethylaminonaphthalen-1-sulfonyl
DFP	Di-isopropyl-fluorophosphat
p-NPGB	p-Nitrophenyl p'-guanidinobenzoat
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenäthylendiamin
TLCK	N ^α -Tosyl-L-Lysylchloromethylketon
TPCK	N ^α -Tosyl-L-Phenylalanylchloromethylketon
Tra	Triäthanolamin

1 EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG

Bei der Erforschung der Mechanismen, die der Befruchtung beim Säugetier zugrunde liegen, haben in den letzten Jahren enzymatische Vorgänge größtes Interesse gewonnen.

Das Akrosom des Spermiums, ein modifiziertes Lysosom mit spezieller Enzymausstattung (1), enthält unter anderem ein proteolytisches Enzym, das hinsichtlich seiner Spaltungsspezifität Plasmin und Trypsin ähnelt und das dem Spermium die Fähigkeit verleiht, die zona pellucida des Eies zu durchdringen (2, 3, 5).

Zaneveld bezeichnete dieses Enzym als Akrosin (3).

Aufgrund der biologischen Bedeutung des Akrosins erschien die Herstellung größerer Mengen für biochemische und biologische Studien wünschenswert. Bislang war nur die Isolierung des Kaninchenakrosins mit Hilfe konventioneller Methoden beschrieben worden (43). Das derart gewonnene Präparat war sehr instabil: 80 % der Aktivität gingen bei der Umstellung vom sauren in den neutralen Bereich verloren. Die Lyophilisation angereicherter Präparate ergab einen nahezu vollständigen Aktivitätsverlust. Außerdem haben die Autoren nur unzureichende, nicht überzeugende Reinheitskriterien angegeben. Die Instabilität des Kaninchenakrosins in neutralen Lösungen machte exakte Studien in dem pH-Bereich unmöglich, in dem das Enzym seine optimale Wirksamkeit entfaltet.

Primäres Ziel dieser Arbeit war es, eine spezifische affinitätschromatographische Methode so auszuarbeiten, daß bei guter Ausbeute Akrosinpräparationen von hohem Reinheitsgrad gewonnen werden können. Die Isolierungsmethode sollte allgemein anwendbar, das heißt, zur Isolierung von Akrosin verschiedener Spezies geeignet sein. Außerdem mußte eine Möglichkeit zur Stabilisierung des gereinigten Akrosin

gefunden werden. Sofern diese Ziele erreichbar waren, sollte das erhaltene Akrosin hinsichtlich seiner biochemischen Eigenschaften eingehend untersucht werden. Die Herstellung von Antikörpern für die Untersuchung der Lokalisation des Akrosins durch Immunofluoreszenz und einer eventuellen kontrazeptiven Wirkung der Antikörper war ebenfalls wünschenswert.

2 EINFÜHRENDE ÜBERSICHT

2.1 Die "Kapazitation" der Spermien und der Befruchtungsvorgang

Die Spermien werden in den Testes gebildet und in der Epididymis gespeichert. Bei der Ejakulation werden den Spermien die Sekrete der ableitenden Samenwege und deren Anhangsdrüsen beigemischt.

Das Sperma wird bei den Säugern entweder in der Vagina oder direkt im Uterus abgelagert. Die Spermien wandern anschließend innerhalb von 4-8 Stunden* zur Ampulle des Eileiters, wo die eigentliche Befruchtung durch Verschmelzung der beiden Gameten stattfindet.

Die Spermien erlangen in der Regel erst während ihrer Wanderung durch den weiblichen Genitaltrakt ihre Befruchtungsfähigkeit - sie werden kapazitiert (10, 11, 12, 13). Der Kapazitationsvorgang ist hormonabhängig. Unter Progesteroneinfluß wird er nahezu vollständig unterbunden, unter Östrogeneinfluß dagegen stark verkürzt (10, 12).

Epididymale und ejakulierte Spermien, die nicht für einige Zeit im weiblichen Genitaltrakt verweilen, sind nicht oder nur bedingt befruchtungsfähig. Eine in-vitro Kapazitation der Spermien durch Inkubation in Follikular- und Tubarflüssigkeit ist möglich (14). Durch Inkubation von bereits kapazitierten Spermien in Seminalplasma werden diese aufs neue befruchtungsunfähig - sie werden dekapazitiert (15, 16). Möglicherweise wird die Kapazitation durch Stoffe aus den cumulus oophorus Zellen ausgelöst (72).

* Neuerdings werden Werte um 10 min. für die schnellsten Spermien beschrieben, demnach erfolgt der Transport offensichtlich passiv durch Uterus- und Tubenkontraktion (85).

2.2 Zur Morphologie und Biochemie von Spermium und Ovum

Die Kopfkappe des Spermium - das Akrosom - enthält unter anderem folgende Enzyme: Hyaluronidase (1, 2), eine Spermien-Neuraminidase (3), ein corona penetrating enzyme (CPE) (17, 18), sowie Akrosin (2, 3, 4), ein proteolytisches Enzym mit Trypsin-ähnlicher Spezifität (Abb. 1).

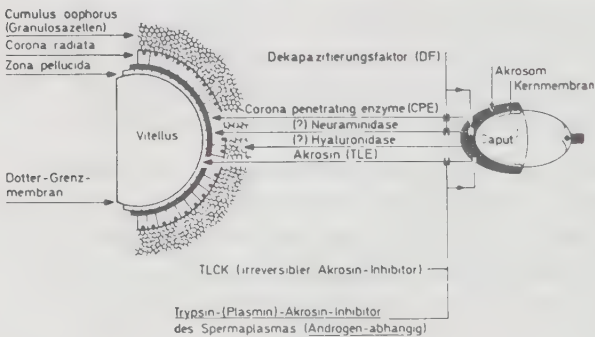


Abb. 1 Schematische Darstellung von Ovum und Spermium mit den Penetrationsenzymen des Akrosoms sowie deren Inhibitoren nach Fritz et al. (19)

Diese Enzymausstattung befähigt das Spermium, die das Ei umhüllenden Zellschichten und Membranen zu durchdringen.

Die äußerste Begrenzung des Eies wird von einer dicken Schicht Granulosazellen (Cumulus oophorus) gebildet, die ihrerseits eine wesentlich dünnere Schicht von corona radiata-Zellen umhüllen. Die corona radiata-Zellen sitzen unmittelbar auf der zona pellucida auf, die aufgrund ihrer Membrannatur und chemischen Zusammensetzung - sie enthält Glykoproteine (20, 21) und Sialinsäuren (22) - dem

penetrierenden Spermium den stärksten Widerstand entgegensetzen dürfte. Die Dottergrenzmembran (Vitellus-Membran) bildet die innerste Begrenzung des Eies.

Kommt der Samenfaden beim Befruchtungsvorgang mit den Zellen der zwei äußersten Eihüllen (cumulus oophorus, corona radiata) in Berührung, so kommt es zur sogenannten Akrosomenreaktion: Die Plasmamembran und die äußere Akrosomenmembran lösen sich durch Verschmelzung in kleine Bläschen auf. Die im Akrosom enthaltenen Enzyme werden somit frei und ebnen dem Spermium den Weg durch die das Ei umgebenden Zellschichten und die zona pellucida (10, 13). Für die Durchdringung der Vitellus-Membran werden von Bedford (23) und Hartree (24) Enzyme des Spermiums verantwortlich gemacht, die im Bereich des Äquatorialssegmente - membrangebunden - lokalisiert sein sollen.

2.3 Corona-penetrating enzyme (CPE) und Dekapazitationsfaktor (DF)

Durch Einwirkung akrosomaler Extrakte von Kaninchen und Mensch (17), sowie durch angereicherte CPE-Substanz (18) auf das befruchtbare Kaninchenei, können die corona radiata Zellen vollständig dispergiert werden. Die zona pellucida wird durch die CPE-Substanz nicht angegriffen. Behandelt man diese akrosomalen Extrakte mit dem Dekapazitationsfaktor (DF), so besitzen diese nur noch eine sehr geringe dispergierende Wirkung auf die corona radiata-Zellen (17).

DF - wahrscheinlich ein Polypeptid mit dem Molekulargewicht um 500 (25) - hemmt somit CPE. Darüberhinaus wird DF eine hemmende Wirkung auf die Spermien-Neuraminidase zugeschrieben.

2.4 Das Akrosin und die Verschmelzung der Gameten

Als das für die Spermienpenetration entscheidende Enzym wurde lange Zeit die Hyaluronidase angesehen (26). Austin (27) und Chang (28),

die mit hochgereinigten Hyaluronidasepräparationen experimentierten, haben diese Auffassung jedoch ernsthaft in Frage gestellt und Stambaugh wies als erster nach, daß die proteolytische Aktivität akrosomaler Extrakte aus Kaninchenspermien für die Auflösung der zona pellucida von wesentlicher Bedeutung ist (29).

Das in seiner Wirkungsspezifität dem Akrosin sehr ähnliche Trypsin vermag die zona pellucida ebenfalls aufzulösen (30).

Das Akrosin stimmt mit dem Trypsin nicht nur in der Spaltungsspezifität gegenüber synthetischen Aminosäurederivaten überein - beide spalten ausschließlich Arginylester beziehungsweise Arginyl- und Lysylamide - sondern beide haben auch, wie wir durch unsere Untersuchungen zeigen konnten (86), ähnliche pH-Optima, sind säurestabil und basisch. Ebenso wie Trypsin wird Akrosin durch die synthetischen Inhibitoren TLCK, DFP und Benzamidin, sowie durch eine Reihe natürlich vorkommender Proteinaseinhibitoren gehemmt, nicht jedoch durch den synthetischen Chymotrypsinhemmstoff TPCK (31).

Die Trypsininhibitoren aus Sojabohnen und Limabohnen und die Trypsin- bzw. Trypsin-Plasmininhibitoren aus Meerschweinchen-Samenblasen (32) sind imstande, die durch akrosomale Spermienextrakte verursachte Auflösung der zona pellucida nahezu vollständig zu unterbinden. Werden kapazitierte Spermien in Gegenwart von Trypsininhibitoren inkubiert, so ist deren Befruchtungsfähigkeit drastisch vermindert (4).

Durch die Untersuchungen mehrerer Autoren kann die Lokalisation des Akrosins im Akrosom des Spermiums als eindeutig erwiesen gelten. (33, 34, 2). Untersuchungen von Stambaugh und Buckley (35), von Hartree (24), von Brown und Hartree (36), sowie von Schill und Wolf (87) sprechen dafür, daß das Akrosin an der inneren akrosomalen Membran gebunden ist.

2.5 Die Akrosininhhibitoren

Die seminalen Akrosininhhibitoren wurden als Trypsininhhibitoren 1965 von Haendle et al, (6, 7) und, unabhängig davon, von Waldschmidt, Hoffmann und Karg (8) entdeckt: Sie kommen in den Vesikulardrüsen und im Sperma der Säugetiere (7, 37) vor und in geringerer Konzentration auch in den epididymalen Sekreten, der rete testis Flüssigkeit (88), dem epididymalen Gewebe und dem Hodengewebe (9, 38, 19).

Tab. 1 Trypsin Inhibitor-Aktivität (mIU) in männlichen Geschlechtsdrüsen und ihren Sekreten nach Haendle (7). Angaben in mIU pro g Gewebe oder ml Sekret.
1 mIU entspricht der Hemmung von ca. 1 g Trypsin.

Spezies	Hoden	Epididymis	Vesikular- drüsen	Seminal- plasma
Mensch	70-100	50- 80	50- 100	150- 330
Rind	40- 70	50- 80	900-1500	2400-3100
Schwein	90-120	70-110	500-1000	800-1200
Schaf	-	-	250- 500	-
Ratte	100-200	90-130	1400-1600	-
Maus	90-130	100-200	2200-2700	-
Meerschweinchen	100-220	300-400	3500-5000	-
Hamster	60- 90	80-120	300- 600	-

Die aus den Vesikulardrüsen der Säugetiere stammenden Trypsin-inhibitoren hemmen Akrosin sehr stark (31). Interessanterweise hemmt von den beiden im Humanspermaplasma vorkommenden niedermolekularen Trypsininhibitoren nur der Trypsin-Akrosin-Inhibitor HUSI II Akrosin, nicht jedoch der Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor HUSI I (40).

Zaneveld und Mitarbeiter haben einen Zusammenhang zwischen dem Vorgang der Kapazitation und der Tatsache gesehen, daß die Aktivität an Akrosin in epididymalen und kapazitierten Spermien hoch, in ejakulierten aber niedrig ist (9). Sie folgerten daraus, daß ein Inhibitor aus den Sekreten der ableitenden Samenwege bei der Ejakulation von den Spermien aufgenommen und bei der Kapazitation wieder abgegeben wird. Zaneveld und Mitarbeiter gingen dabei von der Annahme aus, daß das Akrosin mit dem Inhibitor innerhalb der Akrosomenkappe einen Komplex bilde (9). Durch Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers gegen den Akrosininhibitor aus Ebersseminalplasma zeigten Fritz, Schill und Heimbürger jedoch, daß der Inhibitor an der äußeren Akrosomenmembran lokalisiert ist. Bei Vergleichsuntersuchungen mit epididymalen und kapazitierten Spermien konnte kein Inhibitor nachgewiesen werden (41). Aus diesen Untersuchungen lassen sich zwar auch Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Kapazitation und Inhibitorwirkung ableiten, die Frage jedoch, ob die Abtrennung des Inhibitors von der Akrosomenmembran einen wesentlichen Inhalt der Kapazitation bildet, wie Zaneveld und Mitarbeiter vermuten (9), kann noch nicht als geklärt gelten. Eventuell spielen weitergehende Veränderungen an der Akrosomenmembran durch Einwirkung von Enzymen aus dem weiblichen Genitaltrakt eine zusätzliche Rolle (72).

2.6 Bisherige Untersuchungen über die proteolytische Aktivität von Spermien und Spermienextrakten

Bereits 1935 beschrieb Yamane (21) die eihüllen-auflösende Aktivität von Spermienextrakten. 1956 wurde durch Buruiana (42) und 1965 durch Waldechmidt, Hoffmann und Karg (8) die tryptinähnliche Aktivität in Spermien und Spermienextrakten etwas eingehender charakterisiert. Polakowski, Zaneveld und Williams konnten ein tryptinähnliches Enzym aus Kaninchenspermien in allerdings sehr instabiler Form isolieren (43). Sie gewannen die akrosomalen Extrakte nach der von Hartree eingeführten Detergentienbehandlung (44), die sie etwas modifizierten (43).

Sie fanden in den neutralen akrosomalen Extrakten aus epididymalen und kapazitierten Spermien verschiedener Spezies hohe Akrosinaktivitäten (45). Neutrale Extrakte aus ejakulierten Spermien wiesen hingegen keine oder nur geringe Akrosinaktivitäten auf. Durch Ansäuern (pH 2-3) der Extrakte ließ sich jedoch Aktivität freisetzen (Dissoziation des im neutralen Extrakt vorliegenden Akrosin-Inhibitor-Komplexes), die durch anschließende Neutralisierung wieder zum Verschwinden gebracht werden konnte (erneute Komplexbildung). Dieser Vorgang ließ sich mehrfach wiederholen - er war also voll reversibel. Durch Chromatographie der neutralen Extrakte an DEAE-Cellulose ließ sich ebenfalls Aktivität freisetzen, ein Inhibitor somit abtrennen (3). Diese Untersuchungen rechtfertigen zwar den Schluß, daß in den Extrakten ein durch Azidifizierung spaltbarer Komplex aus Akrosin und Akrosininhibitor vorliegt, nach den im vorigen Abschnitt gemachten Ausführungen scheint es jedoch zweifelhaft, daß dieser Komplex im Spermium selbst physiologischerweise vorliegt. Im Spermaplasma liegt er aber vor, da auch unter nicht pathologischen Bedingungen ein Teil der ejakulierten Spermien seine Kopfkappen verloren hat (gealterte Spermien). Das dadurch freigesetzte Akrosin, das ein beträchtliches proteolytisches Potential darstellt, wird offensichtlich durch Komplexbildung mit dem Inhibitor daran gehindert, eine schädigende Wirkung an den Schleimhäuten des Genitaltraktes oder an anderen Spermien zu entfalten.

Die Reinigung der akrosomalen Extrakte durch Zaneveld und Mitarbeiter erfolgte durch alkoholische Fällung, Chromatographie an DEAE-Cellulose und Gelfiltration über Sephadex G-100 in leicht saurem Milieu. Da das von ihnen isolierte Akrosin, wie bereits erwähnt, sehr unbeständig ist, geben die von den Autoren durchgeführten Messungen mit Protein-Proteinaseinhibitoren nur qualitative Anhaltspunkte. Darüberhinaus birgt ihre Isolierungsmethode die Gefahr in sich, daß es bei der Gewinnung der Extrakte durch neutrale Detergentienlösungen während der 90-minütigen Inkubation bei 37⁰ (43) zu einem Abbau von Akrosin durch andere im Sperma vorkommende Proteasen oder durch Akrosin selbst (Autolyse) kommt.

Die Arbeitsgruppe von Morton entwickelte eine Methode zur Ablösung der Kopfkappen durch Schüttelung der Spermien suspension mit Glas-puder (46). Dieses Verfahren wurde von Multamäki und Niemi bei der Isolierung des Bullenakrosins angewandt (47). Pedersen entfernte die Kopfkappen durch wiederholtes Frieren und Auftauen und anschließendes Waschen mit neutral gepufferter Saccharoselösung. Beide Verfahren führen jedoch zu unbefriedigenden Ausbeuten (48).

Die in unserer Arbeitsgruppe durch Fink et al. entwickelte Methode der Spermien-Extraktion mit verdünnter Essigsäure umgeht diese Schwierigkeiten, ist einfach durchführbar und erbringt hohe Ausbeuten (49).

3 AKROSIN AUS EBERSPERMIEN: ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG

3.1 Gewinnung und Extraktion der Spermien

Die Spermien wurden durch Besamungstechniker der Prüf- und Besamungsstation München-Aubing e.V. am Phantom unter Zuhilfenahme einer artifiziellen Vagina gewonnen.* Aus den Drüsen der ableitenden Samenwege stammende Schleimstoffe, die etwa 20 % des Spermavolumens ausmachen, wurden durch Filtration über grobmaschige Gaze abgetrennt.

Bei unseren Untersuchungen verwendeten wir sowohl Ebersperma, das mit einer Konservierungslösung verdünnt längere Zeit (7-14 Tage bei 4°C) gelagert hatte, als auch unverdünntes, frisch ejakuliertes Sperma.

Wie in Abschnitt 4.2.1 im Detail beschrieben, wurden die Spermien-suspensionen zentrifugiert und die sedimentierten Spermien mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Durch den Waschvorgang wurden Stoffe des Seminalplasmas, die unspezifisch an die Akrosomen- bzw. Plasmamembranen adsorbiert sind, weitgehend entfernt. Gewaschene Spermien, die aus gelagerten verdünnten Ejakulaten gewonnen wurden, konnten nun sofort extrahiert werden

Bei der Verwendung von Frischsperma machten wir die Beobachtung, daß die erzielten Ausbeuten an Akrosinaktivität erheblich unter denen lagen, die wir bei der Verwendung von gelagertem Sperma erhielten. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Untersuchungen von Schill an Humansperma (50), der auch hier bei Lagerung eine Zunahme der Aktivität fand. Schill beobachtete außerdem, daß der Zusatz von

* Herrn H. Kreutmayer, Herrn G. Obernöder und Herrn F. Schrödobler möchte ich für die Unterstützung unserer Sammelaktion herzlich danken.

10 % Glycerin zu den Spermaproben die Ausbeute an Akrosinaktivität bei der anschließenden Extraktion beträchtlich erhöht.

Für dieses Phänomen gibt es zwei mögliche Deutungen: Entweder liegt das Akrosin in Form eines Proenzymes (Zymogen) vor, welches nach Zusatz von Glycerin über im einzelnen noch nicht geklärte Schritte aktiviert wird, oder das Glycerin wirkt auf die Akrosomenmembranen in der Richtung ein, daß im Säuren mehr Akrosin extrahiert werden kann. Bei Alterung der Spermien findet sich auch eine Erhöhung der extrahierbaren Akrosinaktivität, die ebenfalls Resultat einer Veränderung der Membranstruktur oder der Aktivierung eines Proenzymes sein könnte.

Um den Einfluß von membranschädigenden Prozeduren auf die extrahierbare Akrosinaktivität zu klären, führten wir folgenden Versuch durch: Drei frisch gewonnene Ejakulate wurden gepoolt (Gesamtmenge 700 ml), gut suspendiert und in 30 aliquote Proben aufgeteilt. Die Proben wurden, wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben, zentrifugiert und das Spermiesediment (Volumina jeweils ca. 1,2 ml) mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen.

Jeweils 6 Sedimentproben wurden einzeln

- a) ohne Vorbehandlung in der beschriebenen Weise extrahiert,
- b) vor der Extraktion bei -196°C eingefroren und unmittelbar danach bei Zimmertemperatur wieder aufgetaut,
- c) vor der Extraktion in 0,067 M Phosphatpuffer, pH 7,8 unter Zusatz von 0,1 % SDS 30 min. bei Zimmertemperatur inkubiert,
- d) vor der Extraktion 30 min. in 0,067 M Phosphatpuffer, pH 7,8 unter Zusatz von 10 % Glycerin 30 min. bei 37°C inkubiert,
- e) vor der Extraktion bei -196°C eingefroren und anschließend 30 min. in 0,067 M Phosphatpuffer, pH 7,8 unter Zusatz von 10 % Glycerin 30 min. bei 37°C inkubiert.

Zur Messung der extrahierten Akrosinaktivität verwendeten wir das in Abschnitt 4.3.1 beschriebene BAEE/ADH Testsystem. Mit diesem Testsystem kann die Akrosinaktivität auch in Lösungen exakt bestimmt

werden, die einen kompetitiven Akrosininhibitor enthalten, vorausgesetzt, daß der Akrosin-Inhibitor Komplex vor der Messung durch Azidifizierung dissoziiert wurde (49). Die erzielten Ausbeuten an Akrosinaktivität sind in Abb. 2 angegeben.

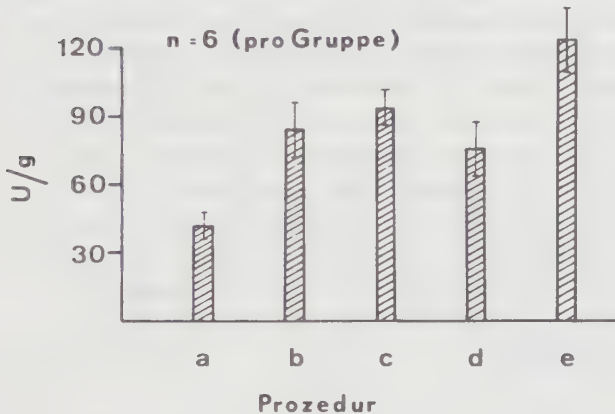


Abb. 2 Der Einfluß von membranschädigenden Prozeduren auf die aus gewaschenen Eberspermien extrahierbare Akrosinaktivität
Abszisse: U/g Spermis sediment, Substrat BAEE

Ordinate: a) Extraktion mit 2 Proz. Essigsäure

b) Vorbehandlung durch Frieren und Tauen

c) Vorinkubation in 0,067M Phosphatpuffer, pH 7,8, 0,1 Proz. SDS

d) Vorinkubation in 0,067 M Phosphatpuffer, pH 7,8,
10 Proz. Glycerin

e) Vorbehandlung durch Frieren und Tauen und anschließender
Inkubation in 0,067 M Phosphatpuffer, pH 7,8,
10 Proz. Glycerin

Innerhalb der einzelnen von a) bis e) bezeichneten Gruppen betrug die Streuung der erzielten Ausbeuten an Aktivität bis zu $\pm 15\%$ vom Mittelwert (jeweils 6 Sedimente wurden pro Gruppe verwendet). Diese Streuung der extrahierbaren Akrosinaktivität ist bei Verwendung verschiedener, nicht gepoolter Ejakulate bedeutend stärker. Ursachen dafür sind, daß das Volumen oder das Gewicht des Sediments über den Anteil an Spermien, die ihre Kopfkappen verloren haben, spermienfremde zelluläre Elemente, bzw. den unterschiedlichen Zustand der Membranen in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer und -form keine Aussagen zuläßt. So schwankten bei uns die Ausbeuten bei 15 Extraktionen und gleicher Aufarbeitung zwischen 8 und 15 U/ml Sediment. Auch die Bestimmung der absoluten Spermienzahl (durch Messung der Spermiedichte) erlaubt keine wesentlich genaueren Aussagen, da der Anteil an Spermien, deren Kopfkappen beschädigt sind, lichtmikroskopisch nicht zu ermitteln ist. Der von Fink et al. angegebene Wert von 70 mU (Substrat BAPA) pro 10^8 Spermien (49) gibt deshalb nur einen Anhaltspunkt für die Größenordnung der extrahierbaren Aktivitäten.

3.2 Trennung des Akrosins von den Inhibitoren durch Gelfiltration

Die Bildung eines Enzym-Inhibitor Komplexes EI unterliegt folgendem Gleichgewicht:



$$\frac{[E][I]}{[EI]} = K_1$$

Dabei bezeichnet E das Enzym, I den Inhibitor und K_1 die Dissoziationskonstante des Komplexes EI. Im neutralen Milieu sind die Dissoziationskonstanten der Komplexe im allgemeinen extrem klein ($< 10^{-8} M$). Bei

pH-Verschiebung ins Alkalische und besonders ins Saure verschiebt sich das Dissoziationsgleichgewicht zugunsten der Einzelkomponenten, bis zur völligen Dissoziation des Komplexes.

Zur Abtrennung des Inhibitors vom Akrosin wurde deshalb eine Gel-filtration in saurem Milieu vorgenommen.

Als für präparative Zwecke besonders geeignet, erwiesen sich Sephadex G 75 und 2 Proz. (V/V) Essigsäure als Elutionsmittel (49). Die nach diesem Schritt erhaltene inhibitorfreie Akrosinlösung weist eine spezifische Aktivität von bis zu 2 U/mg Protein (Substrat BAPA) auf (Abb. 3).

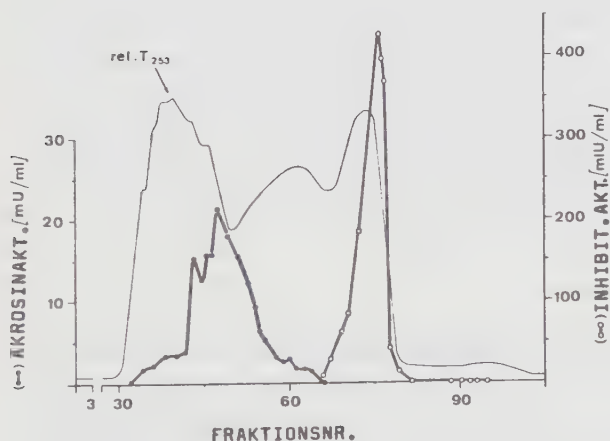


Abb. 3 Trennung von Akrosin und Akrosininhibitor durch Gel filtration. Linke Ordinate: Relative Transmission bei 253 nm in %. Rechte Ordinate: mU Akrosin pro ml (Substrat: BAPA) Abszisse: Elutionsvolumen in ml

3.3 Affinitätschromatographie

3.3.1 Allgemeines

Die zur Trennung von Proteinen seit langem eingeführten Verfahren der Gelchromatographie und der Ionenaustauschchromatographie fraktionieren die Substanzen nach Maßgabe ihrer unterschiedlichen Molekülgrößen bzw. ihrer unterschiedlichen Ladungen. Das Auflösungsvermögen beider Verfahren ist deshalb naturgemäß begrenzt durch den Anteil an Fremdprotein ähnlicher Ladung und ähnlicher Molekülgröße im Ausgangsmaterial.

Die Affinitätschromatographie nutzt dagegen hochspezifische Eigenschaften biologisch aktiver Moleküle zu deren Isolierung: Ihre Antigenität, ihre Substratspezifität oder ihre Hemmspezifität. Das Prinzip dieser Trennmethode besteht darin, daß ein Reaktionspartner der zu isolierenden Substanz, z.B. ein Antikörper, ein Inhibitor oder ein anderer spezifischer Rezeptor als Ligand an einen wasserunlöslichen Träger gebunden wird. An diesen unlöslichen Reaktionspartner werden nun die zu isolierenden Moleküle selektiv gebunden (Tab. 2; Abb. 4).

Tab. 2 Beispiele zur Affinitätschromatographie

Ligand	Reaktionspartner
Enzym	Inhibitor
Inhibitor	Enzym
Antikörper	Antigen
Antigen	Antikörper

Soll ein Enzym isoliert werden, so wird zweckmäßigerweise ein möglichst spezifischer Inhibitor als Ligand verwendet. Zumeist wird das Addukt Matrix-Inhibitor in eine Säule gefüllt. Beschickt man die Säule mit einer enzymhaltigen Lösung unter Bedingungen, bei denen das Gleichgewicht der Reaktion $E+I \rightleftharpoons EI$ weitestgehend auf der Seite des Komplexes liegt, so wird das Enzym gebunden, während inaktives Protein die Säule passiert. Die Elution des Enzyms kann durch Verlagerung des Reaktionsgleichgewichts in Richtung der Einzelkomponenten, d.h. Veränderung der Ionenstärke, des pH oder durch Zusatz eines kompetitiven Inhibitors in geeigneter Konzentration zum Elutionspuffer bewirkt werden.

Die erfolgreiche Anwendung der Methode erfordert, daß die Trägerharze und die Liganden eine Reihe günstiger Eigenschaften aufweisen. Die unlösliche Matrix sollte möglichst keine unspezifische Wechselwirkung mit Proteinen eingehen. Sie sollte ein mechanisch stabiles, poröses Netzwerk bilden, welches leichten Durchtritt von Makromolekülen erlaubt und während des Gebrauches günstige Durchflusseigenschaften aufweisen. Die chemische Struktur der Matrix muß eine einfache Bindung der Liganden unter relativ milden Bedingungen und bei guter Ausbeute erlauben. Die Bindung zwischen Ligand und Matrix muß unter den Bedingungen der Adsorption und Elution stabil sein. Der Inhibitor muß durch die Einschaltung von Zwischengruppen (sogenannten "Spacern") eine solche Entfernung von der unlöslichen Matrix aufweisen, daß sterische Behinderungen des Bindungsprozesses ausgeschaltet sind. Die genannten Bedingungen erfüllen in unterschiedlicher Weise Cellulose, Agarose und Polyacrylamid-Gele.

3.3.2 Reinigung von Eberakrosin unter Verwendung von p-Aminobenzamidinsuccinylaminohexyl-cellulose (ABA-SAH-Cellulose)

Die Isolierung von Eberakrosin durch Affinitätschromatographie wurde bereits von Fink et al. beschrieben (49). Diese Autoren ver-

wendeten als Matrix Amino-äthylcellulose, die mit dem Inhibitor aus Sojabohnen (Bowman-Birk-Typ) als Ligand verknüpft worden war. Die damit gewonnenen Akrosin-Präparationen wiesen spezifische Aktivitäten bis zu 5 U/g (Substrat BAPA) auf. Dieses Verfahren hatte jedoch eine Reihe von Nachteilen: Der Ligand ist relativ groß und außerdem säurelabil. Dadurch ist einerseits die Beladungskapazität des Harzes sehr begrenzt und andererseits die Elution des Enzyms erschwert. Die Ausbeuten waren relativ gering (35-75 %) und das Verfahren somit für präparative Zwecke in größerem Maßstab nicht geeignet.

Da Benzamidin ein guter Hemmstoff für Akrosin (31) und gegenüber extremen Bedingungen unempfindlich ist, war zu erwarten, daß sich trägergebundenes Benzamidin als spezifisches Adsorbens für Akrosin bewähren würde.

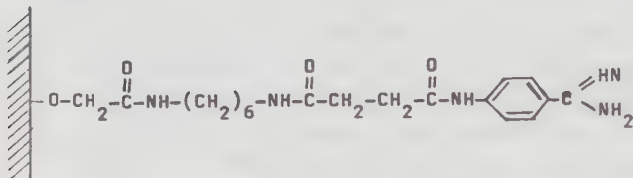


Abb. 4 p-Aminobenzamidin-succinylaminohexyl-cellulose

Das spezifische Adsorbens ABA-SAH-Cellulose (vgl. Abb. 4) wurde uns von der Firma Merck zur Verfügung gestellt.

Zur Beseitigung von löslichen Benzamidinanteilen und Cellulosebestandteilen wird das Harz ausgiebig in Pufferlösungen hoher Ionenstärke suspendiert und anschließend sedimentiert. Dieser Waschvorgang wird so lange wiederholt, bis die Extinktion bei 280 nm im Überstand (Benzamidin absorbiert bei 280 nm) der Extinktion des Waschpuffers

entspricht. Alternativ kann der Waschvorgang in einer Säule unter Anschluß eines UV-Detektors mit gekoppeltem Schreiber durchgeführt werden (vgl. Abschnitt 4.2.5).

Das Gleichgewicht der Reaktion zwischen Akrosin und p-Aminobenzamidin liegt im neutralen Milieu auf der Seite des Komplexes. Die durch Gelfiltration gewonnene inhibitorfreie Akrosinlösung wird deshalb neutralisiert und durch Zugabe von kristallinem Kochsalz auf 1 M Na^+ -Konzentration eingestellt (die experimentellen Einzelheiten sind in Abschnitt 4.2.5 beschrieben). Beim Neutralisieren fällt zwischen pH 6 und pH 7 Protein aus, das Spuren von Akrosin mitreißt. Das ausgefallene Protein wird durch Zentrifugation entfernt. Aus dem Niederschlag kann durch Extraktion mit 2 Proz. Essigsäure die verloren gegangene Akrosinaktivität quantitativ zurückgewonnen werden.

Die hohe Ionenstärke der Akrosinlösung soll beim anschließenden Prozeß der Adsorption verhindern, daß Fremdproteine oder Akrosin unspezifisch an geladene Gruppen der ABA-SAH-Cellulose gebunden werden.

Die ABA-SAH-Cellulose wird in 0,1 M Tris/HCl Puffer, der ebenfalls durch Kochsalz-Zugabe auf die Ionenstärke von 1 gebracht wurde, äquilibriert und mit dem gleichen Volumen an demselben Puffer gequollenen Sephadex G 25 versetzt. Diese Mischung wird in der neutralen Akrosinlösung suspendiert und die Suspension unter Kühlung (4°C) 2 Stunden vorsichtig gerührt und anschließend zentrifugiert. Die akrosinspezifische Bindungskapazität von 15 g feuchter (entsprechend 2,5 g trockener) Benzamidincellulose war durch die maximale Menge an Akrosin, die zur Verwendung kam (12 mg) nicht erschöpft. 10 bis 20 % der Akrosinaktivität, die man für den Versuch einsetzt, verbleiben im Überstand. Dieser wird konzentriert und für die weiteren Experimente verwendet.

Die ABA-SAH-Cellulose (an die Akrosin gebunden ist) wird nun in eine gekühlte Plastiksäule gefüllt. Diese Säule wird mit 1 M NaCl,

0,1 M Glycin/HCl Puffer pH 3 äquilibriert bis ein angeschlossener UV-Detektor mit gekoppeltem Schreiber (Uvicord) konstante Transmission bei 253 nm anzeigt, und im Eluat ein konstanter pH von 3,0 erreicht ist. Nun wird der Puffer gewechselt: Zur Dissoziation des Akrosin-Inhibitor-Komplexes und damit zur Elution des Akrosins wird 0,1 M NaCl, 0,1 M Glycin/HCl Puffer pH 2,0 verwendet. Die Akrosinfraktion wird in einem sehr kleinen Puffervolumen eluiert. Das Elutionsdiagramm zeigt Abb. 5.

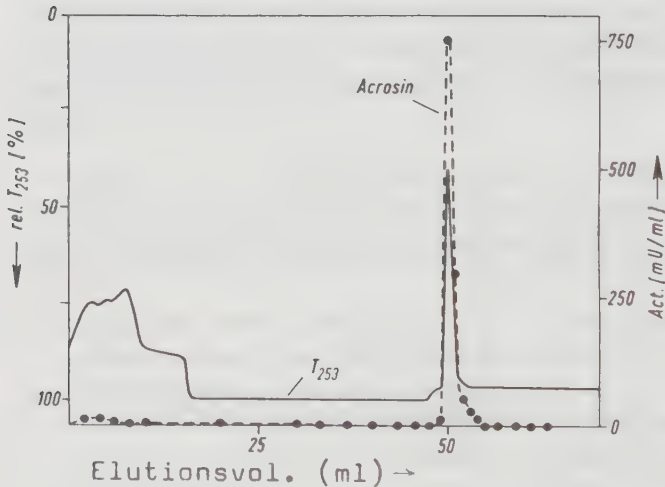


Abb. 5 Affinitätschromatographie mit p-Aminobenzamidin-succinylaminohexyl-cellulose. Rechte Ordinate: mU Akrosin/ml (Substrat BLNA; 1 mU entspricht 14 mU wenn BAPA verwendet wird). Abszisse: Elutionsvolumen in ml

3.4 Stabilisierung des Akrosins

Das Arbeiten mit Akrosin war bislang durch die Labilität des Enzyms außerordentlich erschwert. Schießler et al. stellten fest, daß Akrosin an aktiven Oberflächen, wie z.B. Glas, inaktiviert wird (31). Glaskontakt der Akrosinlösung muß deshalb strikt vermieden werden. Ähnliche Beobachtungen machten Bixler und Niemann mit verdünnten Lösungen von α -Chymotrypsin (52).

Aus den essigsauren, noch inhibitorhaltigen Extrakten kann nach Aufbewahrung bei 4°C noch nach Monaten Akrosin gewonnen werden. Die durch Gelfiltration gereinigten Präparationen verlieren dagegen ihre proteolytische Aktivität auch bei Aufbewahrung im Säuren im Verlaufe von Wochen. Bei den durch Affinitätschromatographie gereinigten Präparationen traten, ebenfalls bei Aufbewahrung im Säuren bei 4°C, schon nach Tagen Verluste von bis zu 30 % der ursprünglichen Aktivität auf. Offensichtlich ist der Grad der Denaturierung von Akrosin in saurer Lösung davon abhängig, welche Menge an Fremdprotein als "Schutzprotein" in der Lösung vorhanden ist.

Neutrale Enzymlösungen zeigten bei Raumtemperatur innerhalb von 24 Stunden einen Verlust von 30 % der ursprünglichen Aktivität. Beim Versuch, die Enzymlösung durch Dialyse zu entsalzen und anschließend zu lyophilisieren, traten bei der Dialyse der hochgereinigten Präparation Verluste von bis zu 30 %, bei der Lyophilisierung Verluste zwischen 60 % und 70 % auf.

Von mehreren Substanzen, die als Stabilisatoren während der Lyophilisierung erprobt wurden, hat sich Saccharose in einer Konzentration von 1,5 Proz. (w/V) am besten bewährt. Die bei der Affinitätschromatographie erhaltene Enzymlösung wird über eine Sephadex G 25 Säule, die mit 1,5 Proz. Saccharoselösung unter Zusatz von 1 % Butanol als Bakteriostatikum entwickelt und äquilibriert wurde, entsalzt. Die Akrosinaktivität wird so quantitativ von der Säule eluiert. Die salzfreie Fraktion wird

nun in silikonisierten Glaskolben lyophilisiert. Bei der Lyophilisierung treten Verluste zwischen 3 % und 8 % auf. Die Saccharose-Akrosin Mischung zeigte auch nach monatelanger Aufbewahrung bei +4°C keinerlei erkennbaren Aktivitätsverlust.

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die einzelnen Isolierungsschritte, die erzielten Ausbeuten und spezifischen Aktivitäten. Die spezifische Aktivität unserer Präparation liegt mit 14,5 U/mg, gemessen gegen BAPA, und mit 1,03 U/mg, gemessen gegen BLNA, um den Faktor 3 höher als die der früher isolierten Präparationen.

Tab. 3 Übersicht über die Isolierung des Eberakrosins. Die Aktivität wurde mit BAPA als Substrat bestimmt. Da die Aktivität in den sauren Extrakten mit BAPA wegen der Anwesenheit des Inhibitors nicht zu ermitteln ist, wurde hier mit Hilfe des BAEE/ADH-Systems getestet, und die spezifische Aktivität für BAPA aus dem Verhältnis der BAEE- und BAPA-Spaltung (erhalten mit reinem Akrosin, Tab. 4) errechnet.

Isolierungsschritt	Spezifische Aktivität	Ausbeute %	Anreicherung
Extraktion mit Essigsäure	0,05- 0,10		
Gelfiltration	0,5 - 1,80	85- 95	5-18
Neutralisierung und Zentrifugation	0,6 - 2,2	95-100	1,2
Affinitätschromatographie	14,5	80- 90	7-24
Entsalzung	14,5	95-100	
Lyophilisierung	12,8-13,8	92- 95	

3.5 Eigenschaften des gereinigten Akrosins

3.5.1 Spaltspezifität und pH-Optima

Wie bereits Schießler et al. (31) nachgewiesen haben, besitzt Akrosin ein trypsinanalogenes enzymatisches Verhalten. Akrosin spaltet BLNA und noch wesentlich besser BAPA und BAEE, nicht aber das chymotrypsinspezifische Substrat BTEE. Die Spaltung von Azocasein durch Akrosin zeigt, daß Akrosin eine Endoproteinase ist. In der folgenden Tabelle sind die spezifischen Aktivitäten gegenüber den Substraten BLNA, BAPA und BAEE angegeben. Die Arginylbindung wird demnach deutlich bevorzugt gespalten.

Tab. 4 Spezifische Aktivitäten von affinitätschromatographisch gereinigtem Akrosin gegenüber den Substraten BLNA, BAPA und BAEE. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte nach den Angaben in (31)

Substrat	U/mg Protein
N -Benzoyl-L-Lysin-p-nitroanilid	1,07
N -Benzoyl-DL-Arginin-p-nitroanilid	14,5
N -Benzoyl-L-Arginin-äthylester	160

Das pH-Optimum der Akrosin-katalysierten Spaltungsaktivität liegt für das Substrat BLNA bei 7,8, für das Substrat L-BAPA bei 7,5 und für das Substrat BAEE bei 7,5 (Abb. 6).

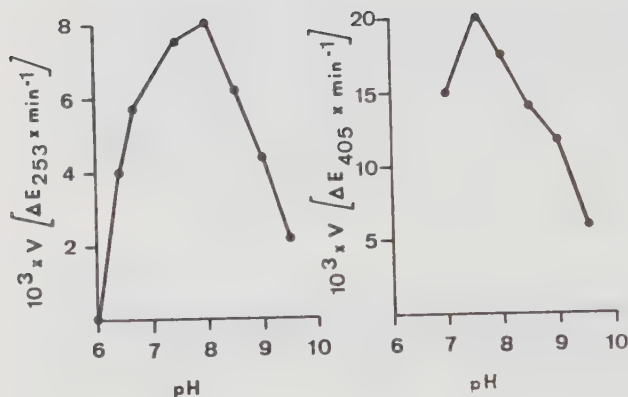


Abb. 6 pH-Optima der Spaltung der Substrate
 N-Benzoyl-L-Arginin-äthylester (links) und
 N-Benzoyl-L-Arginin-p-nitroanilid (rechts)
 Ordinate: Reaktionsgeschwindigkeit in Extinktions-
 änderung/min. Abszisse: pH des Reaktionsmilieus
 Die pH-Optima der Spaltung der Substrate
 N-Benzoyl-DL-Arginin-äthylester und
 N-Benzoyl-L-Lysinester sind von Fink et al. (49)
 angegeben worden

3.5.2 Elektrophoretische Untersuchungen

Die hochgereinigte Enzympräparation wurde elektrophoretisch auf Einheitlichkeit geprüft. In der Celluloseacetatfolien-Elektrophorese wandert Akrosin in schwach alkalischem Milieu (pH 8,3) zur Kathode, es ist also ähnlich wie Trypsin ein basisches Protein. Die meisten der Proben zeigten bei pH 8,3 eine Fraktion, nur einige Proben zeigten noch eine zusätzliche Nebenfraktion. Die Abtrennung der schwächeren Fraktion von der Hauptfraktion erwies sich als nicht eindeutig reproduzierbar. Möglicherweise handelt es sich bei der Nebenfraktion um die genetische Variante eines Isoenzym oder um ein Autolyseprodukt. Bei pH 4,1 zeigten alle Proben nur eine scharfe Proteinbande (Abb. 7).

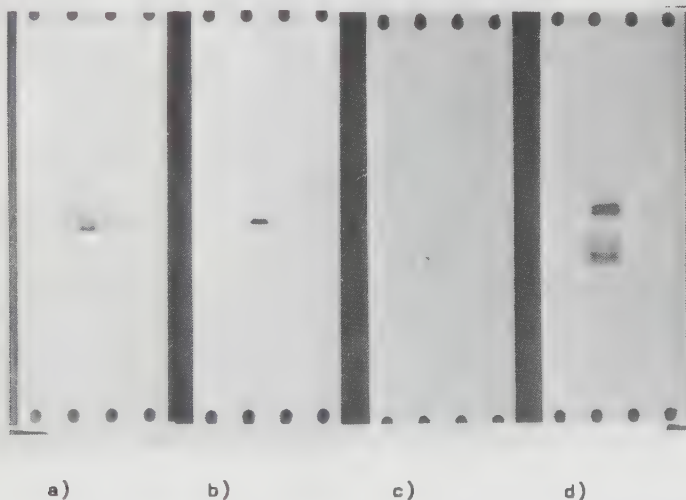


Abb. 7 Celluloseacetatfolien-Elektrophorese von Akrosin im Vergleich mit Trypsin: a), b) und c) Akrosin; d) Trypsin. Für die genauen experimentellen Angaben vgl. Abschnitt 4.2.9

Eine wesentlich bessere Auftrennung von Makromolekülen gelingt im Vergleich zur herkömmlichen Celluloseacetatfolien-Elektrophorese mit der von Ornstein eingeführten Polyacrylamidgel-Elektrophorese (53). Diese Methode verbindet das Prinzip der Molekularsiebung mit dem der unterschiedlich raschen Wanderung geladener Makromoleküle im elektrischen Feld. Abb. 8 zeigt einen Vergleich der Reinheitsgrade der Akrosinpräparationen auf verschiedenen Stufen der Isolierung. Nach der Affinitätschromatographie ist nur noch eine Bande sichtbar (Gel 3).

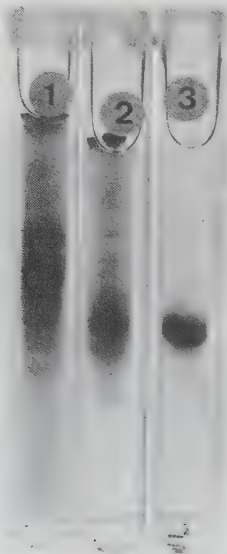


Abb. 8 Polyacrylamidgel-Elektrophorese von Akrosinpräparationen verschiedenen Reinheitsgrades.

Gel 1) Essigsaurer Spermienextrakt

Gel 2) Nach Gelfiltration (Inhibitor-Abtrennung)

Gel 3) Nach Affinitätschromatographie

Für die genauen experimentellen Angaben vgl. Abschnitt 4.2.9

Die proteolytische Aktivität der Akrosinfraktion kann durch Verwendung eines Gels, in das 1 Proz. (w/V) Gelatine einpolymerisiert ist, direkt nachgewiesen werden. Nach der Elektrophorese im schwach sauren Milieu wird das Gel in neutraler Pufferlösung inkubiert. Dabei wird an der Stelle, an der sich Akrosin befindet, die Gelatine verdaut. Bei der anschließenden Färbung mit einem Gemisch aus Ponceau S, Lichtgrün und Amidoschwarz wird diese "verdaute" Zone nicht angefärbt (Abb. 9).

Im Spermienextrakt lassen sich zwei proteolytisch aktive Fraktionen sicher nachweisen. Zwei weitere Lysiszonen sind nur schwach angedeutet. Im affinitätschromatographisch gereinigten Präparat ist nur eine Lysiszone sichtbar. Nur nach längerzeitiger Verdauung (Gel 3, Abb. 9) ist hier eine zweite, sehr schwache Bande zu erkennen. Hierbei handelt es sich entweder um ein zweites proteolytisch aktives Enzym, das ebenfalls durch Benzamidin gehemmt wird, oder um ein "Iso"-Akrosin, das z.B. durch Autolyse (Spaltung einer oder mehrerer Peptidbindungen) aus dem Akrosin entstanden ist. Die Konzentration dieser zweiten Fraktion ist jedoch so gering, daß ihre präparative Anreicherung bisher nicht gelungen ist.

3.5.3 Molekulargewichtsabschätzung

Das als Denaturierungsmittel schon lange bekannte Natriumdodecylsulfat (SDS) hat die Eigenschaft mit Proteinen so zu assoziieren, daß diese sich aufrollen und eine gestreckte, "stabförmige" Struktur annehmen (73). Voraussetzung dafür ist, daß die die Tertiärstruktur stabilisierenden Disulfidbrücken von Proteinen durch reduzierende Reagentien wie 2-Mercaptoäthanol oder Dithiothreitol gespalten werden und so in die ihrer Struktur zugrunde liegenden Polypeptidketten dissoziieren können. Wenn dabei genügend SDS vorhanden ist, so binden die Polypeptid- bzw. Proteinketten im allgemeinen konstante Mengen SDS pro Gewichtseinheit.

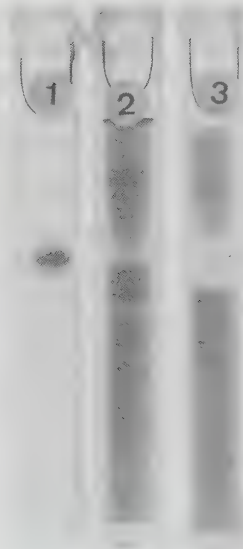


Abb. 9 Nachweis der gelatinolytischen Aktivität von Akrosin in Polyacrylamidgelen

Gel 1) Polyacrylamidgel-Elektrophorese von affinitätschromatographisch gereinigtem Akrosin (Gel ohne Gelatinezusatz). Direkter Nachweis durch Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliant Blue.

Gel 2) Nachweis der gelatinolytischen Aktivität des Spermien-Extrakts im gelatinehaltigen Gel.

Gel 3) Nachweis der gelatinolytischen Aktivität des affinitätschromatographisch gereinigten Präparats im gelatinehaltigen Gel.

Die experimentellen Einzelheiten sind in Abschnitt 4.2.9 beschrieben

Das denaturierte Protein verfügt dann über eine negative Gesamtladung, welche seine wirkliche Ladung maskiert (74). Aufgrund der "stabförmigen" Struktur der Protein-SDS Komplexe besteht eine Proportionalität zwischen der Länge des Komplexes und der Länge und der Länge des Polypeptids und damit auch seinem Molekulargewicht (73).

Polyacrylamidgel-Elektrophorese in Anwesenheit von SDS und Disulfidbrücken reduzierenden Reagentien trennt deshalb Polypeptidketten nach Maßgabe ihres Molekulargewichtes auf. Somit kann die Größe einer oder mehrerer Polypeptidketten eines Proteins durch den Vergleich ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit auf SDS-Gelen mit der elektrophoretischen Beweglichkeit von Referenzproteinen mit genau bekannten Molekulargewichten bestimmt werden (54).

Die elektrophoretische Beweglichkeit ist definiert als das Verhältnis der Strecke, die die Polypeptidkette im Gel gewandert ist, zu der Strecke, die ein Markerfarbstoff (Bromphenolblau) zurückgelegt hat.

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese ist einfach und rasch durchführbar und erfordert nur Microgrammengen an Protein. Im Gegensatz zur Gelchromatographie, bei der die Molekülgestalt das Elutionsverhalten erheblich beeinflusst (75), spielt aus den eingangs angeführten Gründen die Molekülgestalt bei der Molekulargewichtsbestimmung durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese keine Rolle. Glykoproteine mit einem Zuckergehalt von mehr als 10 % zeigen eine verminderte Bindungsfähigkeit für SDS und deshalb eine im Verhältnis zu zuckerfreien Proteinen gleichen Molekulargewichts verminderte Beweglichkeit (76). Glykoproteine weisen jedoch auch auf Dextrangelen ein abnormes Elutionsverhalten auf, das zu beträchtlichen Fehlern bei der Molekulargewichtsabschätzung führt (77). Da das Auflösungsvermögen bei der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese besser ist als bei der Gelchromatographie, können Referenzproteine verwendet werden, deren Molekulargewichte sehr

nah an dem Molekulargewicht der zu untersuchenden Substanz liegen. Die Molekulargewichtsabschätzung durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese ist deshalb im allgemeinen genauer als die Molekulargewichtsabschätzung durch Gelchromatographie.

Wir führten mit dem hochgereinigten Akrosin nach Reduktion der Disulfidbrücken mit 2-Merkaptoethanol eine SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese auf einem 10 proz. Gel durch. Abb. 10 zeigt das Eichdiagramm, in dem die elektrophoretische Beweglichkeit von 6 Referenzproteinen gegen das Molekulargewicht im logarithmischen Maßstab aufgetragen ist.

Im mit Coomassie-Brilliant Blue gefärbten Gel (Abb. 11) ist eine Hauptbande sichtbar, sowie zwei Proteinfractionen, die etwas rascher gewandert sind und ca. je 10 % des Gesamtproteins ausmachen. Aus dem Eichdiagramm lassen sich für die Akrosin-Hauptfraktion ein Molekulargewicht von 38 000 und für die Nebenfraktionen Werte von 37 000 bzw. 34 000 ermitteln. Substanzen mit einem so großen Unterschied im Molekulargewicht sind im nativen, unreduzierten Protein mit großer Wahrscheinlichkeit nicht vorhanden, sonst wären sie bei der Polyacrylamidgel-Elektrophorese (ohne Zusatz von SDS) aufgetrennt worden, da hierbei Proteine sowohl nach Maßgabe ihrer Ladungen als auch ihrer Molekülgröße getrennt werden; es sei denn, es trete der unwahrscheinliche Fall ein, daß Unterschiede in der Molekülgröße durch entsprechende Unterschiede in der Ladung kompensiert würden.

Die Anwesenheit der beiden rascher wandernden Nebenfraktionen ist zu erklären, wenn wir annehmen, daß die Akrosinpräparation Moleküle enthält, in denen eine oder mehrere Peptidbindungen durch die Einwirkung von Proteinasen - vielleicht durch Akrosin selbst - gespalten worden sind. Die Peptide von geringerem Molekulargewicht (1 000 - 4 000), die nach Reduktion der Disulfidbrücken vom nativen Protein dann abgetrennt werden, sind unter den von uns gewählten Bedingungen nicht nachweisbar. Im Falle des Trypsins sind ähnliche Erscheinungen gut bekannt (55).

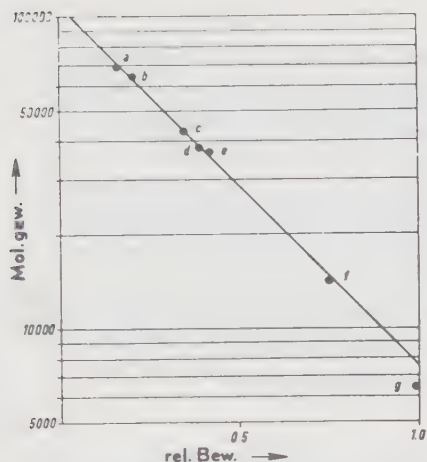


Abb. 10 Eichdiagramm zur Bestimmung des Molekulargewichts des Akrosins durch SDS-Polyacrylamid-gel-Elektrophorese
Ordinate: Molekulargewicht im logarithmischen Maßstab
Abszisse: Relative Beweglichkeit der Proteine (Wanderungsstrecke des Proteins durch Wanderungsstrecke von Bromphenolblau)

- a) Alkalische Phosphatase, MG 69 000
- b) Glukose-6-phosphatdehydrogenase, MG 64 000
- c) Albumin aus Hühnereiklar, MG 43 000
- d) Akrosin (Hauptfraktion)
- e) Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase, MG 37 000
- f) Ribonuklease aus Rinderpankreas, MG 14 000
- g) Basischer Proteinaseinhibitor aus Seeanemonen, MG 6 500

(a) (b) (c) (d) (e) (f) (g)

Abb. 11 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von Akrosin und den Referenzproteinen
Zur Bezeichnung vgl. Abb. 10.

Die experimentellen Einzelheiten sind in Abschnitt 4.2.10 beschrieben

Möglicherweise ist auch schon vom Hauptmolekül durch die Reduktion der Disulfidbrücken eine Polypeptidkette mit kleinerem Molekulargewicht abgespalten worden, die entweder durch Einwirkung einer Proteinase auf das native Molekül entstanden ist oder natürlicherweise vorliegt. Das Molekulargewicht des nativen Akrosins könnte demnach höher (bis etwa 42 000) liegen. Derartige Beobachtungen machten Magnusson und Mitarbeiter beim Thrombin (78).

Abb. 11 demonstriert auch die Empfindlichkeit der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Wir verwendeten nur Referenzproteine, die vom Hersteller als "reinst" oder "elektrophoretisch einheitlich" deklariert worden waren.

Aufgrund der Ergebnisse, die bei der Polyacrylamidgel- und SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese erhalten wurden, können wir annehmen, daß unsere Isolierungsmethode zu einem Präparat von hohem Reinheitsgrad führt. Weitere Untersuchungen, wie die präparative Trennung der bei der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese auftretenden Haupt- und Nebenfraktionen, sowie Endgruppen- und Aminosäureanalysen müssen ergeben, ob eventuell - ähnlich wie beim Trypsin - enzymatisch modifizierte Akrosinmoleküle vom nativen Akrosin für die geplante Sequenzierung abgetrennt werden müssen. Modifizierte Akrosine könnten sowohl Spaltstellen im Molekül enthalten als auch durch Abspaltung einer oder mehrerer Aminosäuren vom C- bzw. N-Terminus verändert sein.

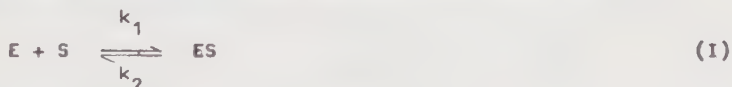
Das für die Hauptkomponente gefundene Molekulargewicht von 38 000 unterscheidet sich beträchtlich von dem Wert, der bei der Fraktionierung saurer Spermienextrakte an Molekularsieben erhalten wurde (31).

Wir führen dies auf die bekannten Schwierigkeiten zurück, die bei der Abschätzung des Molekulargewichts mittels Gelfiltration auftreten können: Die Neigung mancher Proteine zur reversiblen Aggregation (79), Unterschiede in der Gestalt nativer Proteine (75) und die im Vergleich zu reinen Proteinen raschere Elution von Glykoproteinen (77), da die Struktur von Glykoproteinen offenbar um so mehr

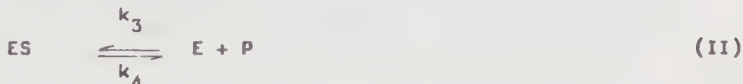
expandiert, je höher der Kohlehydratgehalt ist (80).

3.5.4 Untersuchungen zur Kinetik der Spaltung von N-Benzoyl-L-Arginin-äthylester und N-Benzoyl-L-Arginin-p-nitroanilid

Nach der allgemeinen Theorie der Enzymwirkung von Michaelis und Menten (56), die später von Briggs und Haldane weiterentwickelt wurde (57), reagiert das Enzym E zunächst mit dem Substrat S unter Bildung eines sogenannten Enzym-Substrat Komplexes:



Der Enzym-Substrat Komplex zerfällt in einem zweiten Reaktionsschritt in Enzym E und Produkt P:



Für die Geschwindigkeit der Bildung des Enzym-Substrat Komplexes gilt:

$$\frac{d [ES]}{dt} = k_1 ([E] - [ES] [S]) - k_2 [ES] - k_3 [ES] \quad (III)$$

Die Konzentration von S, das in der Form von ES gebunden ist, ist gegenüber S sehr klein und kann deshalb vernachlässigt werden. Die Menge an ES, die in der Rückreaktion aus E und P gebildet wird, ist normalerweise ebenfalls sehr klein und kann deshalb auch vernachlässigt werden.

Ist die Reaktion im Gleichgewicht, d.h. entspricht die Geschwindigkeit der Bildung von ES der Geschwindigkeit der Dissoziation des Komplexes, so wird:

$$\frac{d [ES]}{dt} = 0 \quad (IV)$$

Und man erhält nach Umstellung:

$$\frac{([E] - [ES])[S]}{[ES]} = \frac{k_2 + k_3}{k_1} = K_M \quad (V)$$

K_M ist die bekannte Michaeliskonstante, eine für jedes Enzym-Substrat-Paar charakteristische Größe.

Durch Auflösung von (V) nach $[ES]$ erhält man:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M + [S]} \quad (VI)$$

Da die Anfangsgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion proportional der Konzentration an ES Komplex ist, gilt:

$$v = k_3 [ES] \quad (VII)$$

Und für die maximale Geschwindigkeit, wenn das gesamte Enzym als ES Komplex vorliegt:

$$v_{\max} = k_3 [E] \quad (VIII)$$

Setzt man für ES in Gleichung (VII) den Wert der Gleichung (VI) ein und dividiert durch die Gleichung (VIII), so erhält man:

$$\frac{v}{v_{\max}} = \frac{k_3 \frac{[E][S]}{K_M + [S]}}{k_3 [E]} \quad (IX)$$

Und durch Auflösung nach v :

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad (X)$$

die Michaelis-Menten Gleichung.

Aus dieser Gleichung ergibt sich, daß bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit ($v = v_{\max}/2$) die Michaeliskonstante der Substratkonzentration entspricht ($K_M = [S]$).

Die Michaeliskonstante K_M kann graphisch aus Daten über die Wirkung der Substratkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit ermittelt werden. Als besonders geeignet für die Bestimmung von K_M hat sich die doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver und Burk (58) erwiesen:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (\text{XI})$$

Eine andere nützliche Umformung, die Eadie-Hofstee Gleichung (59), ergibt die Multiplikation von (XI) mit $v_{\max} \cdot v$ und die anschließende Auflösung nach v :

$$v = -K_M \frac{v}{[S]} + v_{\max} \quad (\text{XII})$$

Trägt man nach der Umformung nach Lineweaver-Burk (XI) bzw. Eadie-Hofstee (XII) graphisch auf, so ergibt sich im idealen Fall jeweils eine Gerade, wobei K_M entweder aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate (XI) oder aus der Steigung der Geraden (XII) ermittelt werden kann.

Aktiviert das Substrat das Enzym, so werden im Lineweaver-Burk und Eadie-Hofstee Diagramm hyperbolische Funktionen erhalten (89).

Aus dem Lineweaver-Burk Diagramm (Abb. 12) errechnet sich für die Akrosin-katalysierte BAEE-Spaltung ein K_M -Wert von $2,5 \cdot 10^{-4}$ Mol/Liter, aus dem Eadie-Hofstee Diagramm (Abb. 13a) ein K_M -Wert von $2,4 \cdot 10^{-4}$ Mol/Liter. Für das Substrat L-BAPA ergab sich im

Eadie-Hofstee Diagramm (Abb. 13b) eine Kurvenform der Funktion, die einer Substrataktivierung entspricht. Eine Aktivierung durch L-BAPA wurde auch für Trypsin beobachtet (60).

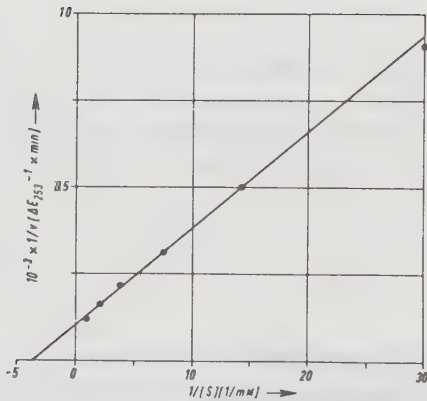


Abb. 12 Graphische Darstellung der Akrosin-katalysierten BAE-Hydrolyse nach Lineweaver-Burk
Bedingungen: 0,045 M Tris/HCl Puffer, pH 8,0
Die experimentellen Einzelheiten sind in Abschnitt 4.2.11 angegeben

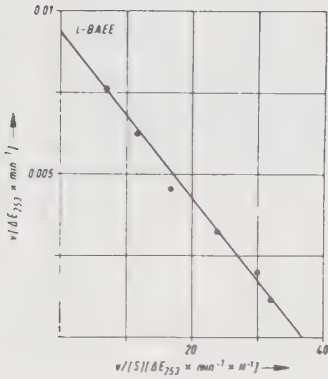


Abb. 13a Graphische Darstellung der Akrosin-katalysierten BAAE-Hydrolyse nach Eadie-Hofstee
Bedingungen: 0,045 M Tre/HCl
Puffer, pH 8,0

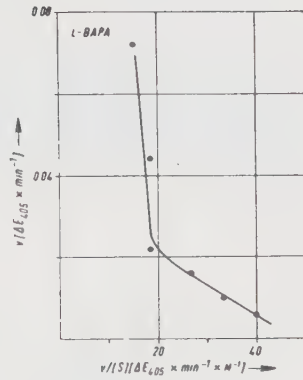


Abb. 13b Graphische Darstellung der Akrosin-katalysierten L-BAPA-Hydrolyse nach Eadie-Hofstee
Bedingungen: 1,33 M Tre/HCl
Puffer, pH 7,5

Die experimentellen Einzelheiten sind in Abschnitt 4.2.11 angegeben

3.5.5 Titration mit p-Nitrophenyl p'-guanidinobenzoat

Beim Akrosin handelt es sich, wie aus der Hemmbarkeit durch DFP ersichtlich (31), um eine sogenannte Serin-Proteinase, d.h. eine Proteinase, an deren katalytischer Wirkung ein Serinrest maßgeblich beteiligt ist. Die durch Serinproteinasen katalysierte Reaktion verläuft unter Bildung eines Acyl-Enzym Zwischenproduktes (61).

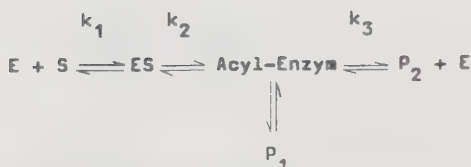
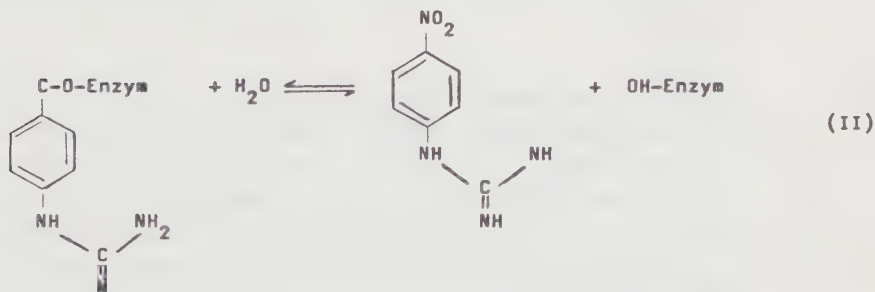
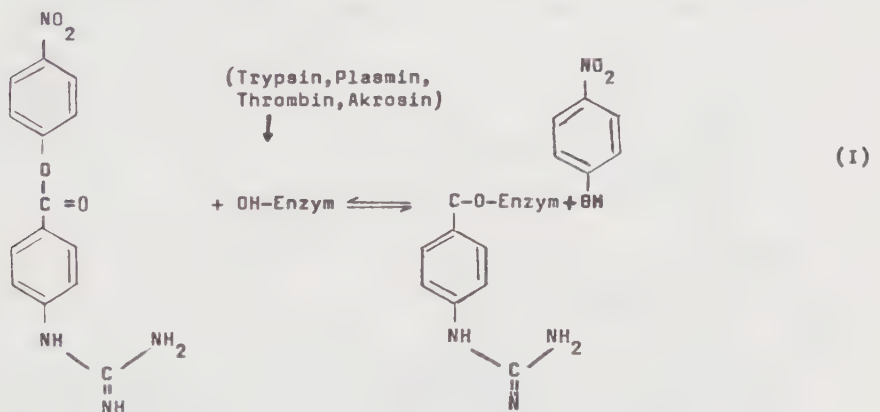


Abb. 14 Hydrolyse eines Substrats durch eine Serinproteinase unter Bildung eines Acyl-Enzym Zwischenproduktes

Im allgemeinen verläuft der Prozeß der Acylierung sehr rasch, der Prozeß der Deacylierung dagegen relativ langsam. Eine Reihe von Reagentien, die gegenüber Serinproteinasen Substrateigenschaften aufweisen, erlauben es, den Prozeß der Acylierung und der Deacylierung quantitativ zu verfolgen. Unter der Voraussetzung, daß $k_3 \ll k_1$, erlaubt die Messung der Reaktion $E + S \rightleftharpoons ES$ Aussagen über die Quantität der aktiven Zentren im Reaktionsgemisch. Die Zahl der aktiven Zentren kann also ähnlich wie eine H^+ -Ionenkonzentration titriert werden. Die Bestimmung des gebildeten Acylenzyms ES selbst ist technisch nicht durchführbar. Die Messung von P_1 führt dagegen dann zu befriedigenden Resultaten, wenn es einen Spektralbereich gibt, in dem P_1 allein absorbiert. Seit der Einführung von p-Nitrophenylacetat als Titrationsmittel für Chymotrypsin durch Hartley und Kilby (62) gilt p-Nitrophenol

als das P_1 der Wahl. Es absorbiert stark im sichtbaren Bereich und kann deshalb bis zu einer Konzentration von 10^{-6} Mol/Liter gemessen werden.

Chase und Shaw fanden, daß p-Nitrophenyl p'-guanidinobenzoat (p-NPGB) als Titrationsmittel für Trypsin ideale Eigenschaften aufweist (63). p-NPGB reagiert mit Trypsin, Plasmin und Thrombin in folgender Weise:



Reaktion (I) geht mit einer sehr raschen Freisetzung von p-Nitrophenol einher. Diese Freisetzung ist als sogenannter "initial burst", d.h. als Extinktionsprung im Photometer direkt verfolgbar. Die anschließende

Deacylierung erfolgt wesentlich langsamer. Extrapoliert man nun die durch die Deacylierung bewirkte Extinktionsänderung pro Zeiteinheit auf den Zeitpunkt 0, so ist der gefundene Extinktionsprung ein direktes Maß für die Zahl der aktiven Enzymmoleküle im System, da nach Gleichung (I) ein Substratmolekül pro Enzymmolekül freigesetzt wird. Dem "initial burst" liegt demnach die stöchiometrische molare 1 : 1-Reaktion zugrunde.

Abb. 15 zeigt als Beispiel die Titration von Trypsin mit p-NPGB.

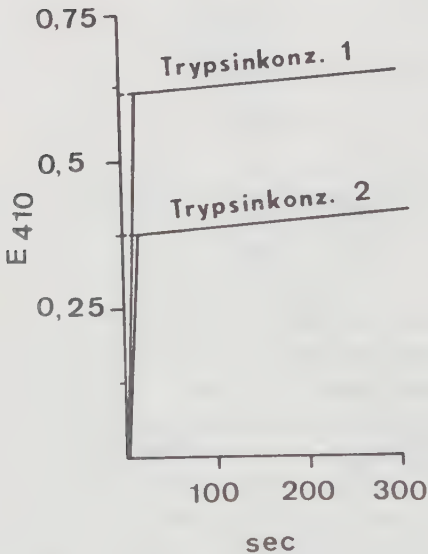


Abb. 15 Titration von β -Trypsin mit p-NPGB
Ordinate: Extinktion bei 410 nm. Abszisse: Zeit in sec.
Aus dem auf die Zeit 0 extrapolierten Wert der Extinktionsänderung ergibt sich ein "initial burst" von 0,624 (Trypsinkonzentration 1) bzw. 0,368 (Trypsinkonzentration 2), woraus sich entsprechend dem molaren Extinktionskoeffizienten von p-Nitrophenol eine Enzymkonzentration von $3,76 \cdot 10^{-5}$ Mol/Liter bzw. $2,22 \cdot 10^{-5}$ Mol/Liter berechnen läßt. (Nach Chase und Shaw (71), verändert)

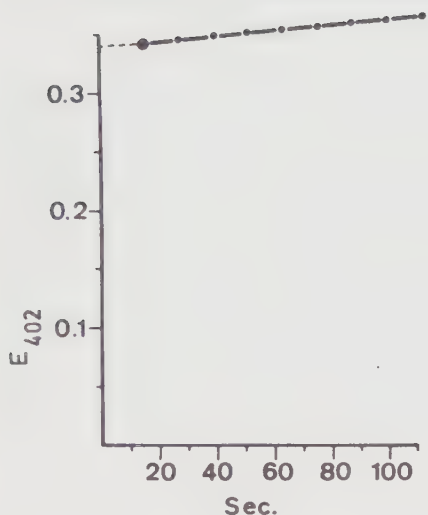


Abb. 16 Titration von Akrosin mit p-NPGB
Ordinate: Extinktion bei 402 nm. Abszisse: Zeit in sec.
Aus dem auf die Zeit 0 extrapolierten Wert der Extinktions-
änderung ergibt sich ein "initial burst" von 0,340, der
einer Enzymkonzentration $1,86 \cdot 10^{-5}$ Mol/Liter entspricht

Nach der Methode von Chase und Shaw (71) titrierten wir Akrosin mit p-NPGB. Wir setzten hierzu eine Menge von 14,5 U Akrosin mit einer spezifischen Aktivität von 12 U/mg in neutral gepufferter Lösung ein (Substrat BAPA). Die Zugabe von 5 μ l einer 10^{-5} M p-NPGB Lösung ergab einen "initial burst" von 0,340 bei 402 nm. Bei einem molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{402} = 18,3$ für p-Nitrophenol unter den angegebenen Bedingungen (71) errechnet sich daraus eine Akrosin-Konzentration von $1,86 \cdot 10^{-5}$ Mol/Liter im Ansatz.

Die molare Aktivität des Akrosins (diese Größe wird auch als Wechselzahl bezeichnet) beträgt demnach gegenüber BAPA 780 mol/min pro mol Akrosin und gegenüber BAEE 8600 mol/min pro mol Akrosin.

3.5.6 Gelfiltration an Sephadex G-100

Makromoleküle werden bei der Gelchromatographie normalerweise infolge von Unterschieden in der Molekülgröße getrennt. Die Gels haben wassergefüllte Hohlräume, in denen Ionen und niedermolekulare Proteine Platz haben, größere Proteine aber nicht. Bei der Wahl von Gelen mit einem geeigneten Trennbereich kann deshalb einheitliches Elutionsverhalten einer Proteinpräparation als Reinheitskriterium herangezogen werden.

Affinitätschromatographisch gereinigtes Akrosin wurde an Sephadex G-100 in einem symmetrischen Peak eluiert, wobei die Aktivitätskurve gemessen mit L-BAPA als Substrat nahezu parallel zur Proteinkurve verläuft (Abb. 17). Die Ausbeute an Aktivität betrug 86 %.

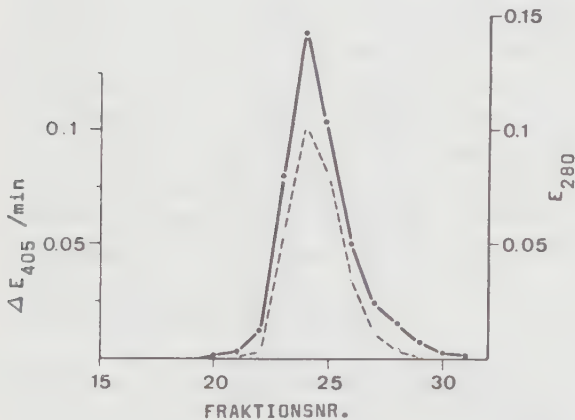


Abb. 17 Gelfiltration von affinitätschromatographischem Akrosin an Sephadex G-100

Linke Ordinate: Akrosinaktivität angegeben in Extinktionsänderung pro Minute bei 405 nm (L-BAPA Testsystem).

Rechte Ordinate: Absorption bei 280 nm.

Abszisse: Anzahl der Fraktionen

Die experimentellen Einzelheiten sind in Abschnitt 4.2.13 beschrieben

3.5.7 Ionenaustauschchromatographie an SP-Sephadex G-50

Da das isolierte Akrosin in der Polyacrylamidgel-Elektrophorese in schwach saurem Milieu einheitlich wanderte, war zu erwarten, daß auch eine Ionenaustauschchromatographie in schwach saurem Milieu keine weitere Auftrennung von aktiven Komponenten ergeben würde. In der Tat wird die Aktivität (gemessen mit BAPA als Substrat) gemeinsam mit dem Hauptproteinpeak eluiert, wenn man die im experimentellen Teil angegebenen Bedingungen verwendet (Abb. 18). Darüberhinaus wird jedoch eine inaktive Vorfraktion abgetrennt, die möglicherweise aus Akrosin besteht, das während der Lyophilisierung denaturiert worden ist. Den definitiven Beweis hierfür kann man jedoch nur durch Aminosäureanalyse beider Fraktionen erbringen.

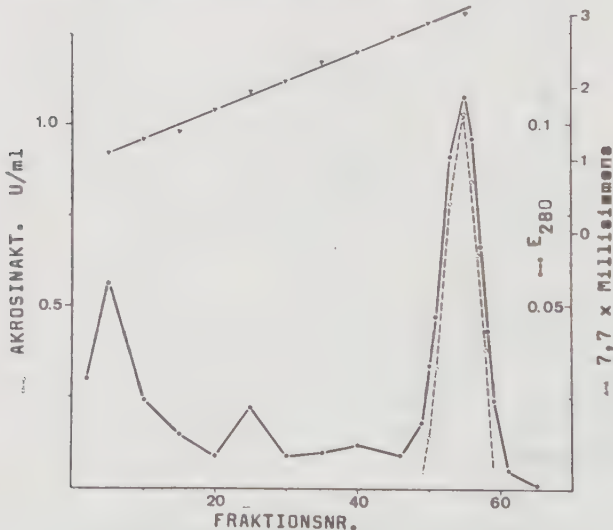


Abb. 18 Ionenaustauschchromatographie von affinitätschromatographisch gereinigtem Akrosin bei pH 4,6 und einem Salzgradienten von 0,2 M - 1 M NaCl

Linke Ordinate: Akrosinaktivität in U/ml (Substrat BAPA).

Rechte Ordinate: Extinktion bei 280 nm und Leitfähigkeit in Millisiemens. Abszisse: Anzahl der Fraktionen.

Die experimentellen Einzelheiten sind in Abschnitt 4.2.14 beschrieben

3.5.8 Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren mittels der Dansyltechnik

Die Identifizierung von Aminosäuren im Mikromaßstab ist durch die Verwendung von Dansylderivaten zuerst durch Weber (65) und später durch Hartley und Massay (66) beträchtlich verbessert worden. Da die Dansylderivate der Aminosäuren im UV-Licht fluoreszieren und relativ unempfindlich gegen Säure (6N HCl, 110°C) sind, eignen sie sich ausgezeichnet zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren (81). Das Prinzip dieser Untersuchungsmethode besteht darin, das Protein zu dansylieren und anschließend einer sauren Hydrolyse zu unterziehen. Aus dem erhaltenen Aminosäurengemisch werden die dansylierten Aminosäuren mit organischen Lösungsmitteln extrahiert und anschließend dünnschichtchromatographisch identifiziert.

Mit Hilfe der Dansyltechnik untersuchten wir die Endgruppen von affinitätschromatographisch gereinigtem Akrosin und von affinitätschromatographisch gereinigtem Akrosin, das noch über einen sauren Ionenaustauscher (vgl. Abschnitt 3.5.7) nachgereinigt worden war. Die Präparate wurden zuvor gelchromatographisch entsalzt und anschließend lyophilisiert. Die Dansylierung und Hydrolyse erfolgte nach den von Gros und Labouesse ausgearbeiteten Bedingungen (83). Chromatographiert wurde nach der Methode von Woods und Wang (84). Die dansylierten Aminosäuren wurden mit Hilfe von Dansyl-Aminosäurestandards identifiziert.

Sowohl bei affinitätschromatographisch gereinigtem Akrosin als auch bei Akrosin, das über einen sauren Ionenaustauscher nachgereinigt worden war, fanden wir neben Alanin auch Valin und Methionin als Endgruppe. Das Alaninderivat war dabei in deutlich größerer Menge vorhanden als das Valin- und Methioninderivat.

Das Vorhandensein von 3 N-terminalen Gruppen kann - ähnlich wie die 3 Banden bei der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese - als ein Hinweis gedeutet werden, daß neben dem nativen Molekül enzymatisch modifizierte Moleküle in unserem Präparat vorliegen. Es ist unwahrscheinlich, daß das native Molekül aus mehreren Ketten besteht, weil dann die Intensität der Fluoreszenz der Dansyl-Aminosäuren auf den Dünnschichtplatten nahezu gleich sein müßte.

Zur weiteren Erhärtung unserer Hypothese haben wir die Hauptbande aus einem SDS-Gel unter den von Weiner et al. beschriebenen Bedingungen eluiert (82). Hierbei wird ein Gel (analytisches Gel) mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt, ein weiteres Gel (präparatives Gel) bleibt ungefärbt. Die Bande von jeweiligem Interesse kann, aufgrund der relativen Beweglichkeit auf dem analytischen Gel, auf dem präparativen Gel lokalisiert und mit einer Rasierklinge ausgeschnitten werden. Die Elution des Proteins gelingt, wenn man diesen Gelabschnitt in Bruchstücke, die nicht dicker als 2 mm sein dürfen, zerteilt, mit 5 ml eines 0,005 M NaHCO_3 Puffers, der 0,05 Proz. SDS enthält, versetzt und 12 Stunden bei 37°C rührt. Die erhaltene Proteinlösung wird lyophilisiert, anschließend wird in der bereits beschriebenen Weise die N-terminale Aminosäure bestimmt. Wir fanden für die Hauptbande als einzige N-terminale Aminosäure Alanin.

Die Herkunft von Dansyl-Valin und Dansyl-Methionin im Hydrolysat des dansylierten nativen Moleküls kann jedoch erst eindeutig geklärt werden, wenn größere Mengen Akrosin vorliegen und nach Reduktion und Alkylierung der Disulfidbrücken die Einzelkomponenten präparativ gewonnen werden können.

3.5.9 Aminosäurezusammensetzung

Die in Tab. 5 angegebene Aminosäurezusammensetzung muß als vorläufiges Ergebnis angesehen werden. Bei der Berechnung der Zahl der Aminosäuren des nativen Proteins wurde ein Molekulargewicht von 38 000 zugrunde gelegt. Bei einem Molekulargewicht dieser Größenordnung ist eine entsprechende Fehlerbreite zu erwarten.

Tab. 5 Aminosäurezusammensetzung (As/mol) des Akrosins (Reinigung durch Affinitätschromatographie und Nachreinigung durch Gelchromatographie über Sephadex G-100 entsprechend den in 4.2.13 gemachten Angaben). Hydrolysezeit: 20 Stunden. Die experimentellen Einzelheiten sind in Abschnitt 4.2.16 beschrieben

Aminosäure	gefundener Wert	As/mol
Asp	28,79	29
Thr	18,60	19
Ser	22,57	23
Glu	30,05	30
Pro	35,47	35
Gly	40,94	41
Ala	21,65	22
Cys	6,02	6
Val	23,03	23
Met	2,88	3
Ile	19,06	19
Leu	25,38	25
Tyr	10,98	11
Phe	9,19	9
Lys	18,71	19
His	6,22	6
Arg	21,84	22
Trp	nicht bestimmt	-

Auffallend ist der hohe Prolingehalt, den Akrosin mit Plasmin, nicht aber mit Trypsin gemeinsam hat.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Material

4.1.1 Substrate

N^{α} -Benzoyl-L-Arginin-äthylester-HCl (Art. 1 672), N^{α} -Benzoyl-DL-Arginin-4-nitroanilid-HCl (Art. 1 670), N^{α} -Benzoyl-L-Lysin-4-nitroanilid-HCl (Art. 10 269); 4-Guanidino-benzoesäure-4-nitrophenylester HCl (Art. 10 562) von E. Merck, Darmstadt; N^{α} -Benzoyl-L-Arginin-p-nitroanilid (Art. 3 057, Protein Research Foundation, Osaka; Art. 10 754 E. Merck, Darmstadt).

4.1.2 Materialien für Säulenchromatographie

Sephadex G-25 medium und Sephadex G-75 von Pharmacia Chemicals, Uppsala.

p-Aminobenzamidin succinylaminohexyl-Cellulose (Charge: TA VI 382/3) von E. Merck Darmstadt.

4.1.3 Materialien für die Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Acrylamid, Methylen-bis-acrylamid und N, N, N', N'-Tetramethylen-aethylendiamin von E. Merck, Darmstadt; Coomassie Brilliant Blue R-250 und Natriumdodecylsulfat von Serva Heidelberg.

Als Referenzproteine für die SDS-Elektrophorese benutzten wir: Alkalische Phosphatase (Art. 15 436) MG 69 000, Glucose-6-phosphatdehydrogenase aus Hefe (Art. 15 304) MG 64 000, Albumin aus Hühnereiklar (15 574) MG 43 000, Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (Art. 15 146) MG 37 000 von Boehringer Mannheim G.m.b.H.; Ribonuklease aus Rinderpankreas (Art. 34 390) MG 14 000 von Serva, Heidelberg; Basischer Proteinaseinhibitor

aus Seeanemonen MG 6 500 (67).

Alle anderen Reagentien waren vom höchsten im Handel erhältlichen Reinheitsgrad von E. Merck Darmstadt.

4.2 Methoden

4.2.1 Gewinnung der Spermien und Vorbereitung zur Extraktion

Das Ebersperma wurde nach der üblichen Methode unter Zuhilfenahme einer artefiziellen Vagina von Angestellten der Prüf- und Besamungsstation München-Aubing e.V. gesammelt und unter Zusatz eines handelsüblichen Verdünners bei 4°C gelagert. Der im Laufe von jeweils ca. 10 Tagen anfallende Spermapool (ca. 6 l) wurde 90 min. lang bei 4°C und 600 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde insgesamt 5 x in jeweils 60 ml physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und anschließend zentrifugiert.

Wurde frisch ejakuliertes Sperma verwendet, so wurde dieses nach dem Waschvorgang in physiologischer Kochsalzlösung bei -196°C eingefroren, bei Zimmertemperatur aufgetaut und anschließend in 0,067 Phosphatpuffer, pH 7,8 unter Zusatz von 10 % Glycerin 30 min. bei Zimmertemperatur inkubiert.

4.2.2 Saure Extraktion

Das so erhaltene Spermiesediment wurde mit 2 Proz. (V/V) Essigsäure, die mit 2 N HCl auf pH 2 eingestellt worden war, in einer Menge die dem doppelten seines Eigenvolumens entsprach versetzt und 15 min. suspendiert. Nach 10 min. langer Zentrifugation bei 1 500 x g wurde der milchig trübe Überstand abdekantiert. Dieser Extraktionsvorgang wurde 5 x wiederholt. Die gesammelten Extrakte wurden 100 min. bei 17 000 x g zentrifugiert.

4.2.3 Konzentration der Extrakte durch Ultrafiltration

Der zentrifugierte mäßig trübe Extrakt wurde durch Ultrafiltration (System Amicon, Membran UM 20 E) bei 4°C im Verlauf von etwa 6 Stunden auf 1/10 seines ursprünglichen Volumens eingengt.

4.2.4 Gelfiltration über Sephadex G-75

Säulenmaße: 130 x 5 cm. Elutionsmittel: 2 Proz. (V/V) Essigsäure. Die Säule wurde auf 4°C gekühlt. Elutionsgeschwindigkeit: 30 ml/sec. Fraktionsvolumen: 7,5 ml.

Die spezifische Aktivität des Akrosins in der inhibitorfreien Fraktion betrug bis zu 1,8 U/mg Protein bei Benutzung von BAPA als Substrat.

Zur Schätzung der Proteinmenge wurde die Absorption der Lösungen bei 280 nm gemessen ($E_{280}^{1\%} = 11,8$, 1 cm Küvette). Als Bezugswert wurde wie durch Fink et al. (49) Gammaglobulin verwendet. Aus 15 ml Spermiensediment konnten nach Extraktion und Gelchromatographie 180 U Akrosin gewonnen werden.

4.2.5 Affinitätschromatographie unter Verwendung von p-Aminobenzamidin succinylaminohexyl-Cellulose

Gleiche Volumina von feuchter ABA-SAH-Cellulose und gequollenem Sephadex G-25 wurden in 1 M NaCl, 0,1 M Tra/HCl, pH 7,8 (NaCl-Tra Puffer) suspendiert und anschließend in eine Säule (20 x 2 cm) gefüllt. Um lösliche Bestandteile aus der Cellulose zu entfernen, wurde die Säule kontinuierlich mit dem beschriebenen NaCl-Tra Puffer durchgewaschen, bis die Transmission des eluierten Puffers bei 253 nm mit der Transmission des ursprünglichen Puffers übereinstimmte. Dann wurde die ABA-SAH-Cellulose/Sephadex G-25 Mischung wieder aus der Säule entfernt.

Die durch Gelfiltration gewonnene essigsäure Akrosinlösung wurde nun im Volumen-Verhältnis von 10:1 mit 1 M Tra/HCl Puffer pH 7,8 versetzt. Durch Zusatz der entsprechenden Menge an kristallinem

Kochsalz wurde eine Konzentration von 1 M NaCl in der Lösung hergestellt. Anschließend wurde die Lösung mit 2 N NaOH auf pH 7,8 eingestellt. Zwischen pH 6 und pH 7 ausfallende Proteine wurden durch Zentrifugation bei 20 000 x g abgetrennt.

30 g der mit NaCl-Tra/HCl Puffer äquilibrierten ABA-SAH-Cellulose/Sephadex G-25 Mischung wurden in 150 ml dieser Lösung suspendiert. Die Suspension wurde 2 Stunden bei 0°-4°C schonend gerührt und anschließend zentrifugiert.

Das Sediment (bestehend aus der ABA-SAH-Cellulose an die Akrosin gebunden ist, und Sephadex G-25) wurde in eine gekühlte (2°C) Plastiksäule (20 x 2 cm) gefüllt. Diese Säule wurde mit 1 M NaCl, 0,1 M Glycin/HCl Puffer pH 3,0 entwickelt, bis im Eluat konstante Transmission bei 253 nm und konstanter pH (3,0) gemessen wurden. Elutionsgeschwindigkeit: 11 ml/h

Fraktionsvolumen: 5,5 ml

Zur Dissoziation des Akrosin-Inhibitor Komplexes und damit zur Elution des Akrosins wurde 0,1 M NaCl, 0,1 M Glycin/HCl Puffer, pH 2,0 verwendet.

4.2.6 Entsalzung und Lyophilisierung

Die Durch Affinitätschromatographie gewonnene Akrosinfraktion wurde sofort auf einer gekühlten (2°C) Sephadex G-25-Säule (135 x 2 cm, äquilibriert mit 1,5 % Saccharose, 1 % (V/V) Butanol in entionisiertem Wasser) entsalzt.

Elutionsgeschwindigkeit: 15 ml/h

Fraktionsvolumen: 7,5 ml

Die Saccharose enthaltende Akrosinlösung wurde in einem silikonisiertem Glaskolben lyophilisiert.

4.2.7 Verwendete Enzymtest-Systeme

BAPA-System

Die Messung der Akrosinaktivität mit Hilfe von BAPA erfolgte nach der für Trypsin angegebenen Vorschrift (68). Reihenfolge der Reagentienzugabe in der Meßküvette:

(2 - x) ml Tris/HCl pH 7,8 plus 1,0 ml BAPA-Lösung plus x ml Akrosinlösung. Die Extinktionsänderung bei 405 nm wurde 10 min. lang in min.-Intervallen registriert. Meßtemperatur 25°C.

BLNA-System

Die Substratlösung enthielt 2,4 mg BLNA/ml dest. Wasser. Die Methodik entspricht dem BAPA-Test.

BAEE/ADH-System

Es wurde die durch Fink et al. (49) angegebene Methode verwendet.

BAEE-System

Die BAEE-Hydrolyse wurde entsprechend den Angaben von Schwert und Takenaka gemessen (69). An Stelle von 0,05 M Tris/HCl Puffer verwendeten wir 0,045 M Tris/HCl Puffer pH 8,0.

4.2.8 Bestimmung der pH-Optima der Spaltung der verwendeten Substrate

Das Optimum der BAEE-Spaltung wurde entsprechend der von uns modifizierten Methode nach Schwert und Takenaka (vgl. Abschnitt 4.2.7) durch Einstellung des angegebenen Puffers mit 2 N HCl auf pH 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 ermittelt. Das Optimum der BAPA-Spaltung wurde entsprechend der angegebenen Methode (vgl. Abschnitt 4.2.7) durch Einstellung des angegebenen Puffers mit 2 N HCl auf pH 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 ermittelt.

4.2.9 Elektrophoretische Prüfung auf Einheitlichkeit

Celluloseacetatfolien-Elektrophorese

Die Untersuchung wurden in einer "Boskamp-Mikrophor" Elektrophorese Apparatur und auf Celluloseacetat-Streifen der Firma Sartorius (Art. 11 200) durchgeführt. Wir verwendeten 2 Puffersysteme: A) 0,05 M Natriumtetraborat, pH 8,3; die Laufzeit betrug bei einer Feldstärke von 12,5 V/cm 20 min. B) 0,2 M Na Acetat-Puffer pH 4,1; die Laufzeit betrug bei einer Feldstärke von 11,25 V/cm ebenfalls 20 min. Die Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blau eingefärbt.

Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Nachweis durch Proteinfärbung.

Die Untersuchungen wurden in einer Shandon Diskalektrophorese-Apparatur mit 7,5 x 4,5 mm Pyrex-Glasröhrchen durchgeführt. Als Spannungsgerät verwendeten wir den Typ 3 371 der Firma LKB. Die Stammlösungen für die Gelzubereitung waren

1 N KOH 48 ml (I)

96 Proz. Essigsäure 17,2 ml

TEMED 4,0 ml

aqua dest. ad 100

Acrylamid 30,0 g (II)

Methylen-bis-Acrylamid 0,8 g

aqua dest. ad 100

Ammoniumpersulfat 0,28 g (III)

aqua dest. ad 100

Das Gel wurde hergestellt durch Mischen von einem Teil (I), zwei Teilen (II), vier Teilen (III) und einem Teil Wasser. Die Laufzeit betrug bei einer Stromstärke von 6 mA/Röhrchen 100 min. Die Durch-

Führung des Versuches erfolgte bei 4°C. Die Färbung erfolgte mit Coomassie-Brilliant Blue nach der in (70) beschriebenen Methode.

Polyacrylamidgel-Elektrophorese mit dem Nachweis der proteolytischen Aktivität im Gel

Die Zusammensetzung des Gels entspricht den Angaben, die im vorigen Absatz gemacht wurden. Anstelle des einen Teils Wasser wurde eine 0,8 proz. Lösung (w/V) von Gelatine in Wasser verwendet. Daraus ergibt sich eine Konzentration der Gelatine im Gel von 0,1 %. Laufzeit und Stromstärke entsprechen den Angaben des vorigen Absatzes. Die Gele werden anschließend 30 Minuten bei 37°C in 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,8 inkubiert und anschließend mit einem Gemisch aus Ponceau S, Lichtgrün und Amidoschwarz gefärbt.

4.2.10 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Molekulargewichtsabschätzung)

Die angewendete Methode ist von Weber, Pringle und Osborn beschrieben worden (70). Es wurde ein Gel mit einer Konzentration von 10 % Acrylamid (0,1 % SDS, 0,15 % TEMED, 0,1 M Natrium Phosphat Puffer pH 7,2) entsprechend der Vorschrift auf Tab. 1, Seite 5 in l.c. (70) hergestellt. Es wurden folgende Referenzproteine verwendet: Alkalische Phosphatase MG 69 000, Glucose-6-phosphat Dehydrogenase aus Hefe MG 64 000, Albumin aus Hühnereiklar MG 43 000, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase MG 37 000, Ribonuklease aus Rinderpankreas MG 14 000, basischer Proteinaseinhibitor aus Seeanemonen MG 6 500. Gefärbt wurde nach der in l.c. (70) beschriebenen Methode mit Coomassie-Brilliant Blue.

4.2.11 Kinetik der Spaltung von N^α-Benzoyl-L-Arginin-äthylester und N^α-Benzoyl-L-Arginin-p-nitroanilid

Die Hydrolyse von N^α-Benzoyl-L-Arginin-äthylester wurde bei 253 nm in 0,045 M Tris/HCl Puffer pH 8 und die von N^α-Benzoyl-

L-Arginin-p-nitroanilid bei 405 nm in 1,33 M Tra/HCl Puffer pH 7,5 im Zeiss Spektralphotometer PM QIII verfolgt. Die verwendeten Quarzküvetten waren silikonisiert, die Reaktionstemperatur betrug 25°C.

1,98 ml Pufferlösung (0,067 M Tra/HCl pH 7,5 bzw. 0,2 M Tra/HCl) wurden mit 20 µl Akrosinlösung vermischt und anschließend 1 ml Substrat in einer Konzentration zugesetzt, so daß die in Abb. 13a und 13b angegebenen molaren Endkonzentrationen erreicht wurden.

4.2.12 Titration mit p-Nitrophenyl p'-guanidinobenzoat

Die Titration mit p-NPGB erfolgte nach den Angaben von Chase und Shaw (71). Die Extinktionsänderung wurde unter Verwendung von silikonisierten 1 ml Quarzküvetten bei 402 nm in einem Zeiss Spektralphotometer PM QIII verfolgt.

4.2.13 Gelfiltration über Sephadex G-100

Säulenmaße: 100 x 1,5 cm.

Elutionsmittel: 0,01 M Ammoniumformiat pH 3,6

Elutionsgeschwindigkeit: 9,8 ml/h

Fraktionsvolumen: 4,9 ml

Die Aktivität wurde mit L-BAPA getestet. Die Extinktion bei 280 nm wurde fraktionsweise am Zeiss Spektralphotometer PM QIII bestimmt. Von der aufgetragenen Menge 30 U wurden 26 U eluiert (Ausbeute 86 %).

4.2.14 Ionenaustauschchromatographie an SP-Sephadex C-50

Säulenmaße: 24 x 1 cm

Elutionsmittel: 0,1 M Na-Acetat Puffer pH 4,6, Gradient: 0,2 M - 1 M NaCl

Elutionsgeschwindigkeit: 6 ml/h

Fraktionsvolumen: 4,5 ml/h

Die Aktivität wurde mit L-BAPA getestet. Die Extinktion bei 280 nm

wurde fraktionsweise am Zeiss Spektralphotometer PM QIII bestimmt. Von der aufgetragenen Menge 6 U wurden 4,8 U eluiert (Ausbeute 80 %).

4.2.15 Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren

Das Akrosin wurde nach der Entsalzung (vgl. Abschnitt 4.2.6) lyophilisiert und nach dem von Groe und Labrosse angegebenen Bedingungen (83) dansyliert. Chromatographiert wurde nach der Methode von Woods und Wang (84) unter Verwendung von DC-Fertigplatten der Firma Schleicher & Schüll, (Art. F 1700)

Die Elution des reduzierten Enzyms aus SDS-Polyacrylamidgelen wurde entsprechend den von Weiner, Platt und Weber angegebenen Bedingungen (82) durchgeführt.

4.2.16 Aminosäureanalysen

40 g Protein wurde in 2 ml 6 N HCl unter Vakuum in zugeschmolzenen Glasröhrchen 20 Stunden bei 110°C hydrolysiert. Die Säure wurde am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck (11-15 mm Hg) entfernt.

Die Aminosäureanalyse der Hydrolysate wurde nach der Methode von Spackman, Stein und Moore (90) mit einem Durrum Aminosäureanalysator Modell 500 durchgeführt. Die quantitative Auswertung erfolgte mittels des Computers PdP 8 von Digital Equipment.

5 AUSBLICK

Die in dieser Arbeit beschriebene Methode zur Isolierung des Akrosins (91) ist im Verlauf der Gewinnung weiterer experimenteller Daten leicht modifiziert worden (92). Wir verwenden als unlöslichen Träger für Benzamidin nicht mehr Cellulose sondern Agarose. Die Beladung des Affinitätsharzes erfolgt nicht mehr im Batch- sondern im Säulenverfahren. Mit Hilfe dieses Verfahrens sind in der Zwischenzeit 140 mg Akrosin hergestellt worden. Wenn nur frisches Ejakulat als Ausgangsmaterial verwendet wird, zeigt das Akrosinpräparat auch in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nur eine Bande (93). Dies bestätigt unsere Annahme, daß es sich bei den durch uns gefundenen zusätzlichen Banden um enzymatisch modifizierte Akrosine handelt. Durch Immunisierung von Kaninchen mit Akrosin konnten beträchtliche Mengen an Akrosinantikörper gewonnen werden. Immunelektrophoretische Untersuchungen zeigten, daß die von uns gewonnene Präparation auch immunologisch einheitlich ist (94).

Es konnte auch Akrosin aus Humanspermien und epididymalen Hamsterspermien mit der von uns beschriebenen Methode isoliert werden (92).

Unsere weiteren Untersuchungen mit Akrosin werden drei Schwerpunkte haben:

5.1 Durch aktive Immunisierung von Säuen mit Akrosin soll versucht werden, die Konzeption zu verhindern und damit ein weiterer Schritt auf einem neuen Weg zur Empfängnisverhütung getan werden.

5.2 Durch Kombination von immunologischen und elektronenmikroskopischen Techniken soll die Lokalisation des Akrosins innerhalb des Akrosoms gesichert werden.

5.3 Durch die Ermittlung der Aminosäuresequenz soll die Stellung des Akrosins innerhalb der Familie der Serinproteinasen untersucht und damit ein weiterer Aufschluß über die Evolution der Proteine im allgemeinen und der Serinproteinasen im besonderen (95) gewonnen werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Es wird ein Verfahren beschrieben, das - allgemein anwendbar - die Isolierung von Akrosin aus den Spermien verschiedener Spezies ermöglicht. Der Isolierungsengang umfaßt:

6.1 Extraktion mit 2 proz. Essigsäure

6.2 Abtrennung von Akrosininhibitoren durch Gelfiltration über Sephadex G-75

6.3 Affinitätschromatographie an p-Aminobenzamidin-succinyl-aminoethyl-Cellulose.

6.4 Durch Zusatz von Saccharose als Stabilisator zur salzfreien Lösung, kann das Enzym mit geringen Aktivitätsverlusten lyophilisiert werden.

6.5 Das Akrosin vom Eber wurde weitgehend rein dargestellt und hinsichtlich seiner enzymatischen Eigenschaften charakterisiert. Eberakrosin ähnelt dem Trypsin sowohl hinsichtlich seiner Spaltungsspezifität als auch seiner pH-Optima. Das isolierte Akrosin ist elektrophoretisch sowie gel- und ionenaustauschchromatographisch einheitlich. Nach Reduktion der Disulfidbrücken und Elektrophorese in Anwesenheit von SDS und 2-Merkapto-äthanol treten neben einer Hauptfraktion zwei Nebenfraktionen geringeren Molekulargewichts auf. Wir werten dies als einen Hinweis, daß Akrosin, ähnlich wie Trypsin, in enzymatisch modifizierten Formen vorliegen kann.

Das Molekulargewicht der Hauptfraktion beträgt, bestimmt durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese, 38 000. Im nativen Präparat liegen 3 N-terminale Aminosäuren vor, die mit Hilfe der Dansyl-technik als Alanin, Valin und Methionin identifiziert wurden. Die bei der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese auftretende Hauptfraktion zeigt als einzige N-terminale Aminosäure Alanin.

6.6 Die Michaeliskonstante K_m beträgt für das Substrat BAEE $2,4 \times 10^{-4}$ Mol/Liter. Beim Substrat L-BAPA wurde eine Aktivierung durch das Substrat beobachtet. Eberakrosin ist mit p-Nitrophenyl p'-guanidinobenzoat titrierbar. Die molare Aktivität gegenüber L-BAPA beträgt: 780 $\mu\text{mol/min}$ pro μmol Akrosin.

6.7 Untersuchungen der Aminosäurezusammensetzung von Akrosin zeigen einen auffallend hohen Prolingehalt, den Akrosin mit Plasmin nicht aber mit Trypsin gemeinsam hat.

6.8 Die Reinderstellung des Akrosins liefert die Voraussetzung für die Ermittlung der Aminosäuresequenz, aus der wichtige weitere Aufschlüsse über die Evolution der Serinproteinasen zu erwarten sind.

Durch aktive Immunisierung von Sauen mit Akrosin können Untersuchungen über einen neuartigen Weg zur Empfängnisverhütung durch Akrosinantikörper eingeleitet werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Dott, H.M., J.T. Dingle, H.B. Fell: *Lysosomes in Biology and Pathology*. North-Holland Publishing Company. Amsterdam, London 1969, S. 230-260; A. Allison, *Scientific American* 217, 62 (1967)
- (2) Stambaugh, R., J. Buckley, J. *Reprod. Fert* 19, 423 (1969); dieselben, *Science* 161, 585 (1968)
- (3) Zaneveld, L.J.D., P.N. Srivastava, W.L. Williams, *J. Reprod. Fert.* 20, 337 (1969)
- (4) Zaneveld, L.J.D., K.L. Polakoski, R.T. Robertson, W.L. Williams, in H. Fritz, H. Tschesche: *Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors*, Munich, 1970. Verlag Walter de Gruyter u. Co., Berlin 1971, S. 236-244
- (5) Zaneveld, L.J.D., B.M. Dragoje and G.F.B. Schumacher, *Science* 177, 702 (1972)
- (6) Haendle, H., H. Fritz, I. Trautschold, E. Werle, *Z. physiol. Chem.* 343, 185 (1965)
- (7) Fritz, H., I. Trautschold, H. Haendle, E. Werle, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 146, 400 (1968)
- (8) Waldschmidt, M., B. Hoffmann, H. Karg, *Zuchthygiene* 1, 15 (1966)
- (9) Zaneveld, L.J.D., K.L. Polakoski, C.W. Foley, W.L. Williams, *Fed. Proc.* 30, Abstr. 2241 (1971)

- (10) Bedford, J.M., in H. Gibian, E.J. Platz: Mammalian Reproduction. 21. Colloquium der Gesellschaft für Biologische Chemie, Mosbach 1970. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1970, S. 124-182
- (11) Austin, C.R., in G. Raspé: Advances in Biosciences 4. Schering Symposium on Mechanisms Involved in Conception, Berlin 1969. Pergamon Press Vieweg Verlag, Braunschweig 1970, S. 5-11
- (12) Chang, M.C. ebenda, S. 13-24
- (13) Bedford, J.M. ebenda, S. 35-50
- (14) Brackett, B.G., ebenda, S. 73-94
- (15) Williams, W.L., R.T. Robertson, W.R. Dukelow, ebenda, S. 61-72
- (16) Chang, M.C., Nature (Lond.) 179, 258 (1957)
- (17) Zaneveld, L.J.D., W.L. Williams, Biol. Reprod. 2, 363 (1970)
- (18) Zaneveld, L.J.D., R.A. McRorie, W.L. Williams, Fed. Proc. Amer. Soc. exp. Biol. 28, 705 (1969)
- (19) Fritz, H., E. Fink, R. Marx, in Marx R., H.A. Thies: Sexualhormone und Blutgerinnung. XIV. Hamburger Symposium über Blutgerinnung 21. und 22. Mai 1971, F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York 1971, S. 33-49
- (20) Mintz, B., Science 138, 594 (1962)

- (21) Yamane, J., Cytologia 6, 233 (1935)
- (22) Soupart, P., Noyes R.W., J. Reprod. Fertil. 8, 251 (1964)
- (23) Bedford, J.M., Biol. Reprod. Suppl. 2, 128 (1970)
- (24) Hartree, E.F., in Of Microbes and Life, p. 271, Eds. J. Monod and E. Borek. Columbia University Press, New York 1971
- (25) Pinsker, M.C., W.L. Williams, Properties of a Spermatozoan Antifertility Faktor. Arch. Biochem. 122, 111 (1967); siehe auch R.T. Robertson, M.C. Pinsker, W.O. Caster, W.L. Williams, Fed. Proc. Amer. Soc. exp. Biol. 28, 705 (1969)
- (26) McLean, D., I.W. Rowlands, Nature 150, 627 (1942)
- (27) Austin, C.R., Nature 162, 63 (1948)
- (28) Chang, M.C., Ann. N.Y. Acad. Sci. 52, 1 192 (1950)
- (29) Stambaugh, R., J. Buckley, Science 161, 585 (1968)
- (30) Chang, M.C., D.M. Hunt, Exp. Cell. Res. 11, 497 (1956)
- (31) Schießler H., H. Fritz, M. Arnhold, E. Fink u. H. Tschesche, Z. Physiol. Chem 353, 1 638 (1972)
- (32) Hasadler, H., H. Ingrisch, E. Werle, Klin. Wschr. 48, 824 (1970)

- (33) Srivastava, P.N., C.E. Adams, E.F. Hartree, J. Reprod. Fertil. 10, 61 (1965)
- (34) Gaddum, P., R.J. Blandau, Science 170, 749 (1970)
- (35) Stambaugh, R., J. Buckley, Fert. Steril. 23, 348 (1970)
- (36) Brown C.R., E.F. Hartree, J. Reprod. Fert. 36, 195 (1974)
- (37) Werle, E., I. Trautschold, H. Haendle, H. Fritz, Ann. N.Y. Acad. Sci. 146, 464 (1968)
- (38) Zaneveld, L.J.D., P.N. Srivastava, W.L. Williams, Proc. Soc. exp. Biol. 133, 1 172 (1970)
- (39) Robertson, R.T., "Masters Thesis", Universität von Georgia, USA, 1969
- (40) Schiegl, H., H. Fritz, Unveröffentlichtes Ergebnis
- (41) Fritz H., W.B. Schill, N. Heimbürger, Unveröffentlichtes Ergebnis
- (42) Buruiana, L.M., Naturwissenschaften 43, 523 (1956)
- (43) Polakoski, K.L., Zaneveld, L.J.D., W.L. Williams, Biol. Reprod. 6, 23 (1972)
- (44) Hartree E.F., P.N. Srivastava, J. Reprod. Fert. 9, 47 (1965)
- (45) Zaneveld, L.J.D., K.L. Polakoski, W.L. Williams, Acrosomes. Biol. Reprod. 9, 219 (1973)

- (46) Morton, B.W., J. Reprod. Fert. 15, 113 (1968)
- (47) Multamäki, S., M. Niemi, Int. J. Fertil. 17, 3 (1972)
- (48) Pedersen, H., J. Reprod. Fert. 31, 99 (1972)
- (49) Fink, E., H. Schießler, M. Arnhold, H. Fritz, Z. Physiol. Chem. 353, 1 633 (1972)
- (50) Schill, W.B., Persönliche Mitteilung
- (51) Schill, W.B., Z. Physiol. Chem. 355, 225 (1974)
- (52) Bixler, R.L., C. Niemann, J. Am. Chem. S. 81, 1 412 (1958)
- (53) Ornstein, L., Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 321 (1964)
- (54) Shapiro, A.L., E. Vinuela, J.V. Maizel, Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 815 (1967)
- (55) Keil, B., in The Enzymes (Boyer, P.D., eds.) 3rd. ed., Vol. 3, Academic Press, New York & London 1971, S. 249-275
- (56) Michaelis, L., M.L. Menten, Biochem. Z. 49, 333 (1913)
- (57) Briggs, G.E., J.B.S. Haldane, Biochem. J. 19, 338 (1925)
- (58) Lineweaver, H., D. Burk, J. Amer. chem. Soc. 56, 658 (1934)

- (59) Hofstee, B.H.J., *Nature* 184, 1 296 (1959)
- (60) Nakata, H., S. Ishii, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 393 (1970)
- (61) Kézdy, F.J., E.T. Kaiser, in: *Methods in Enzymology* (Colowick, S.P., & N.O. Kaplan, eds.) Vol. XIX, Academic Press, New York & London 1970, S. 3-20
- (62) Hartley, B.S., B.A. Kilby, *Biochem. J.* 56, 288 (1954)
- (63) Chase, T.Jr., E. Shaw, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29, 508 (1967)
- (64) Fiedler, F., B. Müller, E. Werle, *European J. Biochem.* 10, 419 (1969)
- (65) Weber, G., *Biochem. J.* 51, 155 (1952)
- (66) Hartley, B.S., V. Massey, *Biochim. Biophys. Acta* 21, 58 (1956)
- (67) Wunderer, G., W. Machleidt, H. Kortmann, K. Kummer & H. Fritz (1973) *Bayer. Symposium V: Proteinase Inhibitoren*, Grosse Ledder, im Druck
- (68) Fritz, H., I. Trautschold, E. Werle (1970) in: *Methoden d. Enzym. Analyse* (Bergmeyer, H.U., Hrsg.), Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., S. 1 021-1 038
- (69) Schwert, G.W., Y. Takenaka, *Biochim. Biophys. Acta* 16, 570-575 (1955)

- (70) Weber, K., J.R. Pringle, M. Osborn, in: Methods in Enzymology (Colowick, S.P. & N.O. Kaplan, eds.) Vol. XXVI, Academic Press, New York & London 1970, S. 3-27
- (71) Chase, T.jr., E. Shaw, in: Methods in Enzymology (Colowick, S.P. & N.O. Kaplan, eds.) Vol. XIX, Academic Press, New York & London 1970, S. 20-27
- (72) Gwatkin, R.B.L., O.F. Andersen, C.F. Hutchinson, J. Reprod. Fert. 30, 389 (1972)
- (73) Reynolds, J.A., C. Tanford, Journ. Biol. Chem. 245, 5 161 (1970)
- (74) Weber, K., M. Osborn, Journ. Biol. Chem. 244, 440 b (1969)
- (75) Siegel, L.M., K.J. Monty, Biochim. Biophys. Acta 112, 346 (1966)
- (76) Bretcher, M.S., Nature (London) New Biol. 231, 229 (1971)
- (77) Whitaker, J.R., Anal. Chem. 35, 1 950 (1963)
- (78) Magnusson, S., Persönliche Mitteilung
- (79) Kakiuchi, K., S. Kato, A. Imanishi, T. Isemura, J. Biochem., Tokyo, 55, 102 (1964)
- (80) Andrews, P., Biochem. J. 91, 222 (1964)
- (81) Gray, W.R., B.S. Hartley, Biochem. Journ. 89, 59 (1963)
- (82) Weiner, A.M., T. Platt, K. Weber, Journ. Biol. Chem. 247, 242 (1972)

- (83) Gros, C., B. Labouesse, European J. Biochem. 7, 463-470 (1969)
- (84) Woods, K.R., K. Wang, Biochim. Biophys. Acta 133, 369 (1967)
- (85) Moghissi, K., Persönliche Mitteilung
- (86) Schleuning, W.-D., H. Fritz, Z. Physiol. Chem. 355, 125 (1974)
- (87) Schill, W.-B., H.H. Wolff, Naturwissenschaften 61, 172 (1974)
- (88) Suominen, J., B.P. Satchel, J. Reprod. Fert., 30, 235 (1971)
- (89) Dixon, M., E.C. Webb: Enzymes. Longman Group Ltd., London 1964, S. 81
- (90) Speckman, D.H., W.H. Stein, S. Moore, Anal. Chem. 30, 1190 (1958)
- (91) Schleuning, W.D., H. Schießler, H. Fritz, Z. Physiol. Chem. 354, 550 (1973)
- (92) Nothdurft, H.D., W.-D. Schleuning, H. Fritz, unveröffentlicht
- (93) Winkler, G., W.-D. Schleuning, H. Fritz, H. Tachesche, unveröffentlicht
- (94) Fritz, H., B. Förg-Brey, W.-D. Schleuning, N. Heimbürger, unveröffentlicht
- (95) Neurath, H., K.A. Walsh, W.P. Winter, Science 158, 1683 (1967)

LEBENS LAUF

Geboren: 6.3.1944 in Görlitz

Vater: Dr. Siegfried Schleuning, Arzt

Mutter: Dr. Ruth Schleuning, geb. Girbig, Ärztin

1950 - 1955: Volksschule in Kammer bei Traunstein

1955 - 1964: Naturwissenschaftlich-Mathematischer Zweig
des Gymnasiums Traunstein
Reifeprüfung: Juli 1964

1964 - 1966: Soldat auf Zeit bei der Bundeswehr

seit Oktober 1966: Studium der Humanmedizin an der Universität
München

WS 68/69: Ärztliche Vorprüfung

15.6.1972: Abschluß der Ärztlichen Prüfung mit der Note
"sehr gut"

1.7.1972 - 28.2.1973: Medizinalassistent am Institut für Klinische
Chemie und Klinische Biochemie der Universi-
tät München, Arbeiten an vorliegender Disser-
tation

1.3.1973 - 31.7.1974: Medizinalassistent an der Chirurgischen
Klinik der Universität München

15.7.1973: Heirat der Studienreferendarin Dorothea
Schleuning, geborene Enne

1.9.1973 - 31.12.1973: Medizinalassistent an der Medizinischen
Poliklinik der Universität München

seit 1.1.1974: Wissenschaftlicher Angestellter am Institut
für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
der Universität München

